

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Centro de Investigaciones sobre Porphirinas y Porphirias (CIPYP)- CONICET-Htal de Clínicas Gral. José de San Martín



Tesis Doctoral

**LA FOTOINACTIVACION BACTERIANA MEDIADA POR PORFIRINAS
EN EL TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES BACTERIANAS**

Director: Dra. Adriana Casas

Co-Director: Dra. Fernanda Buzzola

Director Adjunto: Dra. Gabriela Di Venosa

Consejero de estudio: Dra. Julieta Marino

Gabriela Cervini Böhm

2017

AGRADECIMIENTOS

Pocas veces se tiene la posibilidad de reconocer públicamente a aquellas personas que nos aman o contribuyen en nuestras vidas de manera positiva, por lo que no quiero perder esta oportunidad de decirle gracias:

A la Doctora Adriana Casas, por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, su consejo y por haberme aceptado en su grupo de trabajo.

A la Doctora Fernanda Buzzola, por su buena disponibilidad y haberme brindado su guía.

A la Doctora Gabriela Di Venosa, por haber sido siempre amable y haberme guiado y brindado su apoyo. Al Doctor Daniel Sáenz, por sus consejos, su confianza y sobretodo su paciencia. En especial les agradezco por la calidez con la que me recibieron.

Al Dr. Leandro Mamone, por haberme orientado en los primeros pasos en el laboratorio. A Lautaro Gándara, por su paciencia y su buena voluntad. A Carla Arraygada por el tiempo y las risas compartidas. A los tres les agradezco por el apoyo brindado y su colaboración.

Al Dr. Edgardo Durantini y al INTI por su colaboración. A Lumia S.A por la provisión del láser de 980 nm. A Belén Parodi y a Leonardo Pazos por las placas de titanio con los distintos tratamientos.

Al grupo que conforma el CIPYP por su buena disponibilidad, su amabilidad y por siempre buscar facilitar mi trabajo.

A Victoria y Vanina, por su calidez de todos los días, por siempre generar un ámbito amigable de trabajo y porque nunca me faltó material.

Al CONICET y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológicas por las Becas otorgadas para la realización de este trabajo de Tesis.

A mamá y a papá, por el apoyo y el amor incondicional y fomentar siempre mi progreso.

A Andrés y a Marcos, por todos los momentos vividos que guardo en el corazón.

A Ale, por ser una personita hermosa y que quiero muchísimo!

A Julián, mi compañero de vida, por haberme dado fuerzas en los momentos más difíciles y por haber festejado conmigo cada logro.

A mis amigas Cami, Nachu, Albertina, y a mi prima Deni por ser mis rocas y pilares, por las risas y los abrazos en los momentos justos. Y a todos mis amigos que me sostienen en esos momentos de desaliento y viven con alegría mis alegrías. Gracias por estar en otro momento tan importante de mi vida.

Resumen

Las enfermedades asociadas a biopelículas bacterianas representan el 80% de las infecciones en humanos. Las infecciones sobre dispositivos médicos implantados resultan un problema clínico de suma importancia, debiéndose la mayoría de ellas, a la formación de biopelículas sobre la superficie de los mismos y la consecuente infección de los tejidos circundantes. La resistencia bacteriana a diferentes antibióticos y la formación de biopelículas dificultan la erradicación de la infección por lo que han emergido otras alternativas terapéuticas como la fotoinactivación bacteriana (FIB).

La FIB es un tratamiento donde se emplea una molécula fotosensibilizante (FS), que luego de ser irradiada con luz visible genera especies reactivas del oxígeno con el consecuente daño sobre los microorganismos a eliminar. En la actualidad, la búsqueda de nuevos FS es una prioridad creciente.

Hemos diseñado una nueva porfirina sintética, 5,10,15,20-tetrakis [4- (3 - N, N dimetilamonio)propoxi) fenil] porfirina (TAPP), que puede adquirir cargas positivas a pH fisiológico, favoreciendo así la interacción con las biomembranas. La irradiación de cultivos planctónicos de *Staphylococcus aureus* incubados con TAPP 2,5 μM e irradiados con una fuente de luz blanca con una potencia de 180 J/cm^2 indujo la erradicación completa de las bacterias. En cambio, para el tratamiento de biopelículas de *S. aureus* se requirieron concentraciones más altas de TAPP y mayores dosis lumínicas (TAPP 20 μM y 180 J/cm^2 se obtuvo una reducción de alrededor de 3 órdenes de magnitud de UFC/ml).

Con el fin de determinar la eficacia de la FIB empleando TAPP en bacterias Gram negativas, se trataron cultivos planctónicos y biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*. Fueron necesarias concentraciones más elevadas de TAPP para lograr la fotosensibilización de bacterias planctónicas (reducción de 3 órdenes de magnitud de las UFC/ml empleando TAPP 20 μM y 180 J/cm^2). Por otro lado, altas concentraciones de TAPP no fueron tóxicas *per se* en las biopelículas de *P. aeruginosa* (TAPP 30 μM y

180 J/cm² se obtuvo una reducción de 3 órdenes de magnitud de las UFC/ml en biopelículas).

Luego de demostrar que TAPP es un FS prometedor y eficiente, se evaluó esta terapia en un modelo de crecimiento de biopelículas crecidas sobre superficies de titanio de uso odontológico para implantes. Se estudiaron biopelículas de *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus epidermidis* crecidas sobre placas de titanio con distintos tratamientos que promueven su osteointegración. Con el fin de potenciar los efectos de la FIB, pre-tratamos las biopelículas con tratamiento fototérmico mediado por láser infrarrojo cercano de 980 nm. La FIB realizada a partir de TAPP a concentraciones entre 0,5 y 5 µM resultó efectiva en la reducción de la viabilidad de las biopelículas de las tres especies estudiadas, reduciendo 2 órdenes de magnitud las UFC/ml en relación a los controles no tratados. El tratamiento previo con el láser de 980 nm, incrementó en un orden de magnitud el efecto bactericida de la FIB sobre las biopelículas.

Por otro lado, se evaluó la respuesta a la FIB del ácido 5-aminolevulínico (ALA), precursor de la síntesis de porfirinas fotosensibilizantes, en cultivos planctónicos y en biopelículas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli* y *P. aeruginosa*. Además, se cuantificó la cantidad y el tipo de porfirinas sintetizadas en los diferentes tratamientos por determinaciones fluorimétricas y por HPLC.

La FIB de *S. aureus* empleando concentraciones entre 1 y 2 mM de ALA, indujo una reducción de 6 órdenes de magnitud de las UFC/ml en cultivo planctónico y 7 órdenes de magnitud de las UFC/ml de biopelículas empleando una dosis lumínica de 213 J/cm². En el caso de *S. epidermidis*, se logró una reducción de 5 órdenes con una incubación de 3 h con ALA 1 mM y una dosis lumínica de 71 J/cm² y con ALA 2 mM y una dosis lumínica de 213 J/cm², en cultivos planctónicos y en biopelículas, respectivamente.

En el caso de *P. aeruginosa*, mostró sensibilidad a ALA-FIB en el cultivo planctónico, reduciendo su viabilidad en 4 órdenes de magnitud a concentraciones altas de ALA (40 mM). En cambio *E. coli*, a pesar de presentar acumulación de porfirinas, no pudo ser fotoinactivada, cuestionando así el paradigma de que la falta de respuesta a la FIB en bacterias Gram negativas se debería a la escasa incorporación de FS en estas células.

El análisis por HPLC de las porfirinas sintetizadas a partir ALA demostró que las mismas son dependientes de la concentración, el tiempo de incubación y la bacteria empleada. Estos perfiles cambian drásticamente con las condiciones de tratamiento y en consecuencia, se observan diferencias en la respuesta a la FIB. Por lo cual, concluimos que es de suma importancia la optimización de las variables en cada tratamiento.

En conclusión, los resultados obtenidos indican que la FIB a partir de TAPP resultaría un tratamiento efectivo en la eliminación de bacterias formadoras de biopelículas sobre superficies de titanio empleadas en implantes de uso clínico, odontológico especialmente. El pre tratamiento fototérmico sensibilizaría las biopelículas a los efectos de la FIB. Además, se ha demostrado la eficacia que posee el tratamiento, empleando ALA en cultivos planctónicos y biopelículas de bacterias Gram positivas y negativas. Por último, se ha concluido que la sensibilidad a este tratamiento está directamente relacionada con el patrón y la cantidad de porfirinas sintetizadas. La FIB tanto a partir de porfirinas sintéticas como endógenas, es un tratamiento prometedor para el control de infecciones bacterianas, especialmente por bacterias Gram positivas, mientras que es necesario mejorar la eficiencia sobre las Gram negativas.

Abreviaturas

ALA: Ácido 5-aminolevulínico

ALA-FIB: Fotoinactivación bacteriana mediada por ALA

BMPs: Proteínas morfogenéticas del hueso

Copro: Coproporfirina

CSLM: Microscopía confocal láser de barrido

DMF: N,N-dimetilformamida

DO: Densidad óptica

EDTA: Etilendiaminotetraacético

EPS: Exopolisacáridos

FIB: Fotoinactivación bacteriana

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FS: Fotosensibilizante/fotosensibilizantes

Hepta: Porfirina de ácido heptacarboxílico

Hexa: porfirina de ácido hexacarboxílico

MEB: Microscopía electrónica de barrido

$^1\text{O}_2$: oxígeno singlete

PBS: Buffer fosfato salino

PIA: Polisacárido intercelular de adhesión

Proto: Protoporfirina IX

PSM: Modulinas solubles en fenol

SAMR: *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina

SEMR: *Staphylococcus epidermidis* meticilina resistente

TAPP: 5,10,15,20-tetrakis[4- (3-N,N-dimetilaminopropoxi)fenil]porfirina

TAPP-FIB: Fotoinactivación bacteriana mediada por TAPP

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TSA: Ágar tripteína de soja

TSB: Caldo tripteína de soja

UFC: Unidades formadoras de colonias

Uro: Uroporfirina

Introducción

Bacterias

I.1 Generalidades

Las bacterias son organismos procariotas que se dividen en su gran mayoría en dos grandes grupos, Gram positivas y Gram negativas, según las características tintoriales de la coloración Gram que reflejan las diferencias estructurales entre los dos grupos (Figura 1). Las bacterias Gram positivas presentan por fuera de la membrana citoplasmática una gruesa pared celular compuesta mayoritariamente por peptidoglicanos. Una de las principales funciones de la pared celular es evitar la lisis osmótica de la célula bacteriana. En cambio, las bacterias Gram negativas poseen dos membranas celulares, una interna y la otra externa. Entre estas dos membranas se encuentra el espacio periplásmico que contiene una pared celular más delgada que en las Gram positivas.

En la naturaleza, las bacterias pueden hallarse en dos formas de vida: planctónica o biopelículas. Las bacterias en estado planctónico se encuentran libres en suspensión y se estima que sólo el 1% de todas las células bacterianas viven en este estado (Nazar, 2007). La agregación bacteriana que conforma la biopelícula puede prolongar la infección y colonización, así como propiciar la diseminación bacteriana a otros sitios corporales. Por cierto, las infecciones asociadas a biopelículas resultan ser una gran problemática para la Salud Pública ya que las mismas representan un 80% de todas las infecciones bacterianas en humanos (Cieplik et al., 2014).

Cabe mencionar que la resistencia microbiana a los antibióticos ha aumentado con la constante utilización de los mismos. En la actualidad, la expansión de la resistencia antibiótica alcanzó a diversas especies y cepas antes sensibles y a un mayor número de antibióticos. La adquisición de tales resistencias se debe, en parte, a la transferencia horizontal de genes, ya sea por transformación, transducción o conjugación. Otra causa de resistencia a los antibióticos es la formación de biopelículas. Particularmente en la clínica, este tipo de resistencia antimicrobiana trae

aparejado serias consecuencias para el control de la infección, los regímenes del tratamiento y el progreso de la enfermedad. Por lo cual, el interés científico ha aumentado en cuanto al estudio de nuevas estrategias antimicrobianas para prevenir, controlar y erradicar infecciones de estas características (Ghannoum et al., 2016; Cieplik et al., 2014).

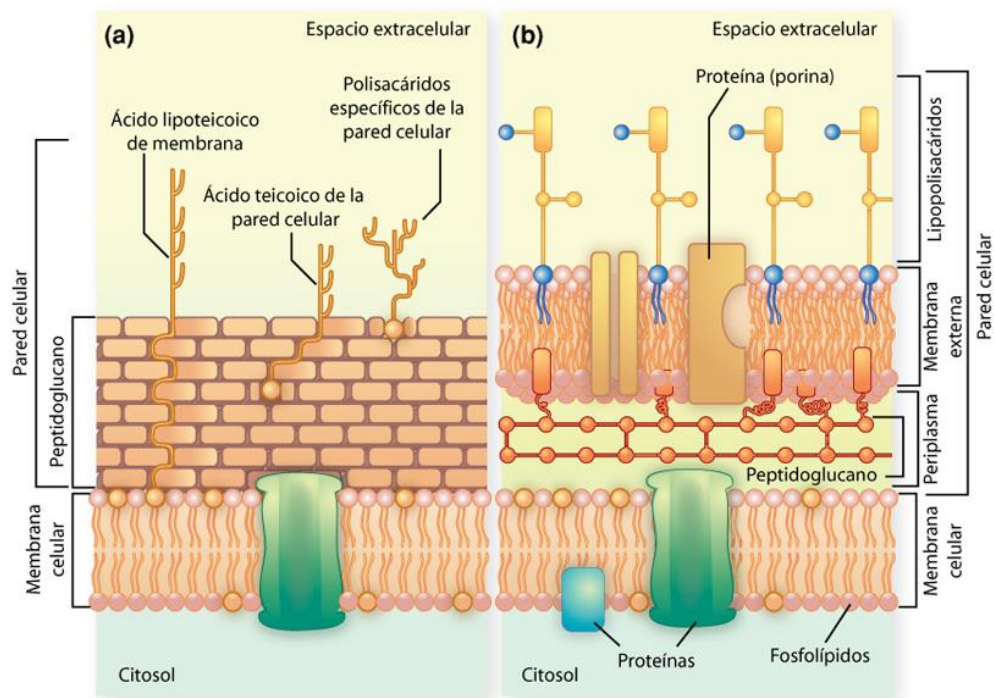


Figura 1: Diferencias estructurales de las envolturas bacterianas. (A) Gram positivas. (B) Gram negativas.

I.1.1 Biopelículas

Una biopelícula es una comunidad de bacterias asociadas a una superficie biótica o abiótica que se haya embebida en una matriz extracelular, conformada por proteínas, ácidos nucleicos y exopolisacáridos (EPS) que ellas mismas producen. Comúnmente estas comunidades están representadas por bacterias Gram positivas, Gram negativas o ambas. Además, es frecuente encontrar biopelículas constituidas por varias especies tales como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*,

Staphylococcus epidermidis, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras (Donlan, 2001).

En el caso de los *Staphylococci*, la matriz extracelular que encierra a la comunidad bacteriana está constituida por el polisacárido intercelular de adhesión (PIA) (Cramton et al., 1999). Este polisacárido consiste en monómeros de N-acetilglucosamina unidos a través de enlaces β -1,6 con residuos parcialmente desacetilados (Figura 2). Los otros constituyentes son proteínas bacterianas secretadas y de superficie, y el ADN liberado por la autólisis (Archer et al., 2011).

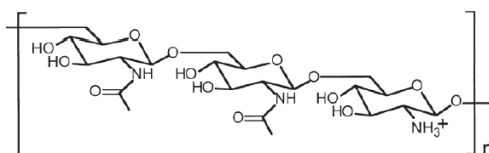


Figura 2: Poli-N-acetilglucosamina. Alrededor de un 20% de los residuos se encuentran desacetilados y poseen, por lo tanto, carga positiva (Gotz, 2002).

La matriz extracelular de las biopelículas de *P. aeruginosa* están constituidas por alginato, ADN extracelular, fimbrias, vesículas de membranas y proteínas (Romeo et al., 2008). El exopolisacárido alginato es un polímero de residuos de ácido β -D-manurónico y α -L-gulurónico se asocia a la característica mucoide de *P. aeruginosa*. Por otro lado, la matriz extracelular de las biopelículas de *E. coli* están formadas por varios exopolisacáridos (celulosa, ácido colánico, PGA o poli- β -1,6-Nacetil-D-glucosamina). Además, los lipooligosacáridos y polisacáridos capsulares pueden acumularse en la matriz y tener un importante rol indirecto en la formación de la biopelícula de esta especie (Romeo et al., 2008).

En general, el proceso de formación de biopelícula (Figura 3) ocurre en cinco pasos principales (Greene, 1995): primero, las células bacterianas se adhieren a la superficie y luego esta adherencia se produce de forma irreversible (etapa dos). En la etapa tres, se produce una maduración de la biopelícula y las bacterias se duplican,

mientras que la maduración de la etapa cuatro implica una movilidad de las bacterias que se encuentran en las capas más interiores hacia las capas superficiales. Por último, en la quinta etapa, se liberan algunas bacterias de la biopelícula al estado planctónico para poder colonizar nuevas superficies.

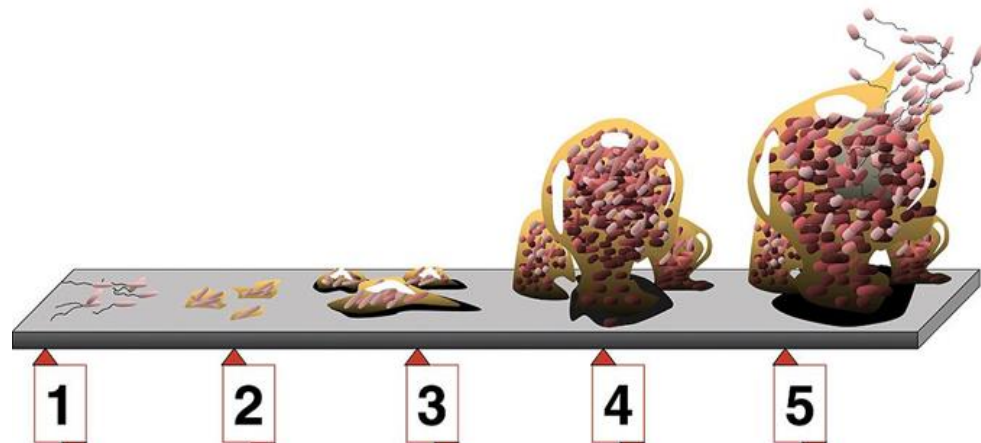


Figura 3: Etapas en la formación de una biopelícula. (1) Adhesión temprana, (2) adherencia irreversible, (3) duplicación bacteriana, (4) movilidad de las bacterias de capas interiores a superficiales, (5) liberación de bacterias al estado planctónico

La adhesión inicial está mediada por propiedades físico-químicas de la superficie celular al igual que factores específicos que median la adherencia a los componentes de la matriz extracelular derivada del huésped (fibronectina, fibrinógeno, entre otros) que rápidamente cubren por ejemplo, la superficie del biomaterial implantado en el paciente (Archer et al., 2011). Una vez que la bacteria se acumula en multicapas de grupos de células, la mayoría de ellas no tienen contacto directo con la superficie, y entonces las interacciones célula a célula llegan a ser esenciales para el desarrollo y mantenimiento de la biopelícula. El número de microorganismos adheridos sobre superficies suele ser mucho mayor que el representado por soluciones y medios en suspensión. Esto se debe principalmente a dos motivos: en primer lugar porque las superficies tienden a acumular y absorber nutrientes (recurso indispensable para los microorganismos que lo habitan) y por otro lado, porque la señal de interacción que genera la adhesión desencadena la activación

y posterior expresión de ciertos genes bacterianos que desembocan en un sistema de quimiotaxis específico que promueve la formación de la biopelícula (Madigan et al., 2008). A este tipo de señalización química de célula a célula se la denomina quorum sensing, y es lo que permite modular de forma diferenciada determinadas características (Donlan, 2002). El sistema de quorum sensing es el mecanismo regulador dependiente de la densidad de población por el cual las bacterias se comunican a través de moléculas de señalización, llamadas autoinductores. Estas moléculas se acumulan en el ambiente debido al aumento de la densidad celular y su función está ligada a la ubicación de sus receptores, presentes en la superficie celular o en el citoplasma. Un autoinductor activa específicamente su receptor afín, que luego activa la transcripción de los genes de detección de quorum. Este fenómeno proporciona un mecanismo para que las bacterias sincronicen su comportamiento social, para comunicarse entre sí y para regular la expresión génica en respuesta a su densidad de población.

La formación de una biopelícula le confiere a las bacterias ciertas propiedades que benefician su sobrevivencia (Romeo et al., 2008). Una de las principales es la barrera física por sí misma; es decir, las células del sistema inmune no logran penetrar la biopelícula y tener contacto con todas las células bacterianas que la conforman, por lo cual son incompetentes para la erradicación del mismo. En el caso de los antibióticos sucede algo similar, la penetración es escasa o no logran hacerlo y, por ende, no llegan a sus dianas de las bacterias que constituyen la biopelícula. Otra de las características, es que dentro de la misma biopelícula, hay bacterias con distinta tasa de crecimiento, debido a que la distribución de los nutrientes dentro de la biopelícula varía. Las bacterias con una tasa metabólica mayor se encuentran en las capas superficiales y las de menor en las internas. Esto le confiere cierta resistencia a algunos antibióticos, ya que la mayoría de los mismos tienen como diana moléculas, enzimas o proteínas relacionadas a un metabolismo activo. Además, en el interior de la biopelícula se observa un efecto cooperativo. Un ejemplo de esto es la sobreproducción y liberación al medio extracelular de β -lactamasas por algunas de las bacterias que conforman la biopelícula, beneficiando así a otras bacterias que se encuentran formando la misma

biopelícula (Brook, 2004; Medaney et al., 2016). En consecuencia, la biopelícula le confiere distintos mecanismos de resistencia a los antibióticos.

Por lo tanto, la formación de la biopelícula es entonces, un proceso complejo y dinámico por el cual las bacterias pueden resistir la acción de elementos celulares (menor exposición a los fagocitos) y/o humores (bajo coeficiente de difusión dentro de la película, menor tasa metabólica de las bacterias que la componen) del sistema inmune del hospedador (Costerton, 1999; de Melo, 2013).

La eliminación de biopelículas puede abordarse desde distintas perspectivas. Algunos autores han propuesto la utilización de moléculas tipo surfactantes para lograr la disrupción de la biopelícula (Otto, 2008). Los péptidos surfactantes extracelulares, como las modulinas solubles en fenol (PSM) de *S. aureus*, tienen un rol central en el mantenimiento de los canales que surcan la matriz de la biopelícula. Estos canales son fundamentales debido a que permiten el pasaje de fluidos posibilitando el intercambio con el medio. La formación de “agujeros” en la matriz, que de otra forma sería uniforme, se logra mediante el desprendimiento de agregados celulares que son emulsificados mediante estos surfactantes. Otra estrategia se basa en el tratamiento con enzimas despolimerizantes (Wainwright et al., 1996; Kaplan et al., 2004; Sass et al., 2007), como por ejemplo la dispersina B, utilizada por *Actinobacillus actinomycetemcomitans* para dispersar células de sus propias biopelículas. Esta enzima es una N-acetil-glucosaminidasa capaz de degradar el PIA de *S. aureus*.

Recientemente se ha propuesto como alternativa innovadora para tratar biopelículas orales resistentes a antibióticos, el uso de bacteriófagos recombinantes de tipos específicos, carentes de toxicidad y con la capacidad de penetrar las biopelículas gracias a la acción de lisinas que actúan como poderosos agentes antimicrobianos. Sin embargo, el aspecto genético y biológico de estos fagos, aún requiere mucha más exploración (Szafranski et al., 2017).

El tratamiento con ozono aplicado durante la desinfección oral de canales radiculares así como el uso de agitación ultrasónica para favorecer el ingreso de hidróxido de calcio a los canales intradentinales, son dos técnicas que también han logrado reducir la viabilidad bacteriana y así lograr una alternativa antimicrobiana (Nogales et al., 2016; Arias et al., 2016).

Por otro lado, la terapia fotodinámica (TFD) es una opción de tratamiento que también se considera exitosa en relación a la resolución de enfermedades periodontales y periimplantitis, así como también efectiva en la erradicación de patógenos que forman biopelículas o en la eliminación de aquellos que se presentan como especies planctónicas (Dale et al., 2017). Por ende, es de particular interés para esta investigación estudiar diversas especies bacterianas responsables de diferentes tipos de infecciones (entre las cuales la formación de biopelícula es preponderante) que han sido tratadas recientemente empleando moléculas inocuas en oscuridad que se activan al combinarse con luz visible (Darabpour et al., 2016; Aspiroz et al., 2017; Misba et al., 2017).

I.2 Bacterias Gram negativas

I.2.1 *Escherichia coli*: Características generales

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo de la familia de las Enterobacterias que se encuentra en el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Es la bacteria anaerobia facultativa comensal más abundante de la microbiota; asimismo, es uno de los organismos patógenos más relevantes en el hombre. Tiene formas sin movilidad y móviles, con flagelos peritricos, no forma esporas y es capaz de fermentar glucosa y lactosa..

La estructura del genoma de *E. coli* es altamente flexible, permitiendo la movilidad de material genético por medio de transposones y plásmidos lo cual le

permite mantener y desplegar sus habilidades patogénicas. Si la bacteria no adquiere elementos genéticos que codifican factores virulentos, actúa como un comensal formando parte de la microbiota intestinal y ayudando así a la absorción de nutrientes. No obstante, las cepas comensales pueden producir infecciones en el paciente inmunodeprimido. Las cepas patógenas de *E. coli*, por el contrario, en cuanto colonizan un huésped sano, pueden producir infecciones de diversa severidad en el intestino, las vías urinarias, meningitis, sepsis, entre otras infecciones (Nataro et al., 1998). *E. coli*, tiene un alto porcentaje de resistencia a ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloramfenicol y ácido nalidíxico, lo que supone grandes complicaciones en el tratamiento antibiótico cuando éste es requerido (Alhashem et al., 2017; Kaushik et al., 2017; Rodrigo-Troyano y Sibila O, 2017).

1.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*: Características generales

P. aeruginosa es una bacteria Gram-negativa y aeróbica. Secreta una variedad de pigmentos como piocianina (azul verdoso), fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente) y piorrubina (rojo pardo).

Es un patógeno oportunista de individuos inmunocomprometidos, infecta los pulmones y las vías respiratorias, las vías urinarias, los tejidos, heridas y también causa sepsis. Pacientes con fibrosis quística a menudo presentan infecciones con *P. aeruginosa* en los pulmones. Se aísla con frecuencia de sitios no estériles como la boca y el esputo, entre otros, y en esas circunstancias suele representar una colonización, sin infección. En cambio, cuando se aísla de sitios estériles como sangre o hueso, resulta más riesgoso y en la mayor parte de los casos requiere tratamiento rápido.

Una de las principales características de este patógeno, es que es naturalmente resistente a una gran cantidad de diferentes familias de antibióticos. Muchos factores son responsables de la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* a los antimicrobianos: una pared celular con baja permeabilidad, un genoma adaptable, elementos genéticos

móviles y la formación de biopelículas (Lambert et al., 2002). Algunos antibióticos consiguen atravesar la pared celular a través de poros, como por ejemplo los carbapenémicos que tienen acceso a través de porinas OprD. La pérdida de estas puede resultar en la resistencia a dichos antibióticos (Livermore et al., 2001; Lister et al., 2009). Incluso los antibióticos que consiguen atravesar la pared celular, pueden ser exportados por una de las muchas bombas de flujo presentes. Varios sistemas de flujo de antibióticos han sido descritos, incluyendo el MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM (Poole et al., 2001). Por otro lado, las mutaciones en *gyrA* modifican la ADN girasa, la cual es una diana de las quinolonas provocando resistencia a este antibiótico (Akasaka et al., 2001).

Aproximadamente el 13% de las infecciones por *P. aeruginosa* son causadas por cepas multi-resistentes (CDC 2013) y las infecciones nosocomiales de *P. aeruginosa* han sido identificadas como un problema sanitario mundial (Rosenthal et al., 2016). La Organización Mundial de la Salud ha nombrado recientemente a *P. aeruginosa* como objetivo de la más alta prioridad para el desarrollo de nuevos antibióticos (OMS, 2017). Las infecciones por *P. aeruginosa* resistentes a multi-antibióticos se asociaron con un aumento del 70% en el costo por paciente en comparación con una infección no resistente (Morales et al., 2012). Debido a las infecciones del tracto urinario asociadas a catéteres ocasionadas por *P. aeruginosa*, se estiman 900.000 días adicionales de hospitalización por año en los Estados Unidos (Warren et al., 2001).

I.3 Bacterias Gram positivas

I.3.1 *Staphylococcus epidermidis*: Características generales

Staphylococcus epidermidis es miembro de la familia *Staphylococcaceae*, perteneciente al phylum Firmicutes. Esta bacteria, coco Gram positivo, no forma esporas. Desde el punto de vista bioquímico, es coagulasa-negativo, lo cual lo distingue

de *Staphylococcus aureus* y algunas especies clínicamente menos importantes de coagulasa positivos.

Es un importante organismo comensal de la piel humana y de las membranas mucosas que podría beneficiar la salud humana en la lucha contra otros microorganismos. Sin embargo, *S. epidermidis* puede causar infecciones oportunistas, particularmente infecciones asociadas a biopelículas en dispositivos médicos implantados. También este patógeno puede diseminarse al torrente sanguíneo y ser causa frecuente de sepsis nosocomia (Otto, 2017).

El creciente uso de dispositivos médicos implantables en los últimos años ha contribuido significativamente al aumento de las infecciones por *S. epidermidis*. El tratamiento de estas infecciones se complica por la aparición de resistencias a los antibióticos, tales como SEMR (*S. epidermidis* meticilina resistente) (Rogers et al., 2009). La respuesta inmune del huésped a una infección asociada a biopelícula de *S. epidermidis* no es protectora ni suficiente. Por lo tanto, la mayoría de éstas son crónicas y el tratamiento a menudo requiere la remoción del dispositivo o del tejido infectado.

1.3.2 *Staphylococcus aureus*: Características generales

Staphylococcus aureus es miembro de la familia Micrococcaceae, perteneciente al phylum Firmicutes. Esta bacteria, coco Gram positivo, presenta una agrupación característica en racimos irregulares ya que al dividirse quedan parcialmente adheridos. Se trata, además, de bacterias que no forman esporas. Desde el punto de vista bioquímico, los estafilococos son catalasa positivos, coagulasa positivos, oxidasa negativos y fermentan el manitol. El color amarillo característico de sus colonias debido a la presencia del pigmento carotenoide estafiloxantina es responsable del nombre asignado a la especie (*aureus*, dorado en latín) (Lowy et al., 1998).

Los seres humanos son el reservorio natural, formando parte de la microbiota normal de la piel y las mucosas (Lowy et al., 1998). La ruptura de alguna de estas barreras permite que este patógeno oportunista cause enfermedad en el hombre (Waldvogel et al., 2000). Además de causar infecciones de piel y partes blandas, *S. aureus* puede causar infecciones severas, agudas o crónicas, tanto a pacientes hospitalizados como a individuos de la comunidad debido a su marcado potencial invasivo (Waldvogel et al., 2000).

Las infecciones asociadas a este microorganismo suelen ser recurrentes o persistentes a pesar de la presencia de anticuerpos específicos y de la terapia antimicrobiana a la cual la bacteria es susceptible. El creciente uso de antibióticos, en particular cefalosporinas y fluoroquinolonas, ha sido un factor importante en la propagación de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (SAMR) tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad (Crowfort et al., 1999; Dziekan et al., 2000). Una preocupación cada vez mayor en referencia al tratamiento de infecciones bacterianas en general, y estafilocócicas en particular, consiste en el aumento de aparición de cepas multiresistentes en la población. En Argentina, la prevalencia de cepas SAMR provenientes del ambiente hospitalario alcanza ya el 50% (Gardella et al., 2005; Jeric et al., 2006), habiéndose reportado incluso aislamientos de SAMR en individuos provenientes de la comunidad (Paganini et al., 2006). El tratamiento de infecciones causadas por SAMR ha recaído tradicionalmente en la vancomicina, antibiótico glicopeptídico considerado como la última línea de defensa frente a la emergencia de cepas resistentes (Jori, 2006). Sin embargo, su sobreutilización ha conducido recientemente a la aparición de cepas vancomicina-resistentes (Appelbaum et al., 2006), tornando prioritario el desarrollo de tratamientos alternativos. La baja eficacia en la terapia antibiótica podría no sólo deberse a la generación de cepas resistentes sino también al hecho de que *S. aureus* puede formar biopelículas, tornándose dificultosa su erradicación del huésped (Archer et al., 2011). Esta bacteria despliega una fuerte capacidad para adherirse irreversiblemente a las superficies de los dispositivos médicos implantados y tejidos dañados formando comunidades bacterianas (Gotz et al., 2002).

I.3.3 *Enterococcus faecalis*: Características generales

Enterococcus faecalis es una bacteria Gram-positiva aerotolerante que se distribuye ampliamente en el medio ambiente natural y en los tractos gastrointestinales de humanos y animales. Entre las diferentes especies Enterocócicas, *E. faecalis* causa infecciones del tracto urinario, bacteriemia, infecciones asociadas a prótesis articulares, infecciones abdominales-pélvicas, endocarditis (Arias et al., 2010; Tornero et al., 2014) e infecciones odontológicas. Las características más importantes de *E. faecalis* son su alta adaptabilidad bajo condiciones ambientales severas y su potencial desarrollo de resistencia a los antibióticos (Arias et al., 2012).

Los Enterococos son responsables de hasta el 20% de todos los casos de infecciones bacterianas, siendo *E. faecalis* aislado en más del 90% de los casos (Arias et al., 2012). El tratamiento con antibióticos elimina las bacterias sensibles de la población bacteriana, dejando bacterias resistentes para crecer y multiplicarse. En *E. faecalis*, los elementos adquiridos, incluidos los genes de resistencia a los antibióticos, se estima que representan más del 25% de su genoma (Paulsen et al 2003). Muestra resistencia intrínseca y adquirida a una variedad de antibióticos. La terapia específica contra los factores de virulencia podría evitar la presión selectiva que presentan los antibióticos. Por lo tanto, estrategias terapéuticas alternativas podrían ser una posible solución para el tratamiento de infecciones de este patógeno oportunista.

II. Implantes odontológicos e infecciones bucales

II.1 Implantes odontológicos

Antiguamente, los implantes quirúrgicos se fabricaban principalmente de oro y plata. A partir del siglo XIX se comenzó a utilizar acero y posteriormente surgieron los de tipo inoxidable junto con las aleaciones de cromo, cobalto y molibdeno. Sin

embargo, fue recién en la década del '40 que el titanio y sus aleaciones químicas adquirieron un rol protagónico en el campo de la medicina. Bothe, Beaton y Dnvenportl observaron su excelente biocompatibilidad luego de colocar implantes en animales y comparar los resultados con los implantes tradicionales (Gil y Planell Estany, 1993). El titanio es fuerte como el acero pero un 45% más liviano y dos veces más fuerte que el aluminio y aun así sólo un 60% más pesado que éste. Entre otras cualidades positivas, el Ti se caracteriza por ser un elemento biológicamente inerte con la capacidad de no corroerse en diversos ambientes naturales, generando hasta posibilidades utilitarias extremas. Estas y muchas más razones ubican al Ti como uno de los elementos metálicos más inocuo y provechoso del planeta (Housley, 2007).

Debido a que hay una necesidad imperiosa de desarrollar nuevas estructuras biocompatibles con los seres vivos, la biomecánica se encuentra desde hace mucho tiempo perfeccionando piezas heterogéneas que tienen como finalidad reemplazar estructuras orgánicas o bien, favorecer su reparación. Numerosos ejemplos pueden ser mencionados, pero el denominador común de los mismos se basa en la inocuidad biológica que los caracteriza. Implantes cocleares, válvulas cardíacas, angioplastias mediadas por stents, prótesis articulares, lentes intraoculares e implantes odontológicos, son algunas de las abundantes aplicaciones que hoy en día posibilitan los biomateriales (Pazos, 2006).

Los biomateriales de tipo metálicos son utilizados generalmente para el desarrollo de implantes óseos, ya que como todo material biocompatible generan una respuesta adecuada por parte del organismo que lo recibe. En base a este último aspecto, los mismos pueden clasificarse en materiales biotolerables (inducen una respuesta mínima, pero finalmente son biológicamente aceptados), bioinertes (aquellos que no tienen la capacidad de generar una respuesta local por parte del sistema inmunitario) y bioactivos (los que posibilitan un estrecho enlace entre el tejido receptor y el material en sí) (Rigo et al., 1999). Usualmente, el tejido óseo suele responder generando un encapsulamiento del biomaterial bajo la forma de fibras de colágeno.

Cuando se trata específicamente de prótesis odontológicas, es necesario tener en cuenta la importancia de utilizar elementos biocompatibles adecuados ya que los mismos estarán sometidos a cargas cíclicas que pueden derivar en roturas como producto de la fatiga mecánica del material. Si bien actualmente hay un gran abanico de materiales, los más utilizados son los de titanio, o bien una aleación de este conocida como Ti6Al4V (Conterno y Pazos, 2003; Pazos et al., 2007).

Sin embargo, más allá de todas las ventajas que proporciona el uso del titanio en implantes odontológicos, algunos autores han reportado reacciones de hipersensibilidad, inflamaciones y en pocas ocasiones encapsulamiento del implante (Carrizo et al., 2014).

Hay dos aspectos relevantes a tener en cuenta en el momento de seleccionar el material con el que se diseñará el implante:

1. **La biocompatibilidad:** esto quiere decir que debe ser aceptado por el tejido receptor, entendiendo que el disturbio generado como consecuencia de la colocación del mismo, es totalmente inevitable.
2. **La superficie:** ya que actualmente se acepta que tanto la topografía como la rugosidad del dispositivo son variables directamente asociadas al éxito o fracaso de una posterior óseo-integración (Conterno y Pazos, 2003).

La propiedad de biocompatibilidad asegura la ausencia de respuesta inmunitaria inflamatoria, necrosis del tejido que rodea al implante, mutaciones celulares (en algunos casos desarrollo de células cancerígenas) y trombos generados como consecuencia de la actividad plaquetaria inesperada (Vanegas et al., 2009).

En lo que se refiere a la superficie del material, actualmente se producen implantes que presentan superficies intencionalmente modificadas convirtiéndolas en

ásperas e irregulares, ya que muchos estudios han evidenciado que este tipo de morfología favorece la integración de la prótesis con el tejido óseo. El objetivo de esta alteración es fomentar una mejor cicatrización en lugar de promover un encapsulamiento fibroso alrededor del dispositivo (Vanegas et al., 2009; Fröjd et al., 2011).

Actualmente existen numerosas técnicas que permiten alterar significativamente la topografía de los implantes (Carrizo et al., 2014). Algunos de ellos poseen recubrimientos de fosfatos de calcio, coberturas de flúor e hidroxiapatita y otros presentan factores de crecimiento como BMPs (proteínas morfogenéticas del hueso) o TGF- β (factor de crecimiento transformante beta). Los dispositivos más modernos contienen proteínas de la familia de las integrinas que permiten incrementar la adhesión celular (Vanegas et al., 2009).

El blasting es uno de los tratamientos habitualmente utilizados. Éste consiste en proyectar una serie de partículas de tipo abrasivas sobre la superficie a tratar, para generar una alteración o rugosidad en el relieve de la misma (Conterno et al., 2004). Estas irregularidades en la micromorfología deben ser menores a 100 micrones y es una de las características más importantes que condicionan el tipo de respuesta del proceso fisiológico (Corengia et al., 2003). Los proyectiles implementados en el blasting pueden variar; algunos ejemplos de ellos son las partículas de vidrio y de Al_2O_3 , siendo otras variables posibles la diversidad de sus tamaños o la distancia a la que son disparadas (Conterno et al., 2004). En algunas oportunidades, las partículas pueden quedar incrustadas en la superficie bombardeada, por lo tanto, las mismas deben estar constituidas por materiales que no alteren la inocuidad del implante, es decir, su biocompatibilidad (Corengia et al., 2003).

Es importante recalcar que la pasividad química y la condición de biocompatibilidad del titanio están dadas por la presencia de un recubrimiento de TiO_2 (Parodi et al., 2004). Esta fina cubierta se forma naturalmente cuando el titanio entra en contacto con el oxígeno y, como consecuencia, proporciona un material apto para

implantes. Esto no sucede si se utiliza el metal en su estado original (Corengia et al., 2003).

Ensayos de mojado han evidenciado que los implantes previamente tratados con blasting son menos hidrofóbicos que aquellos tratados de forma mecánica (Corengia et al., 2003). Este estudio, de carácter cualitativo, permite evaluar el ángulo de contacto a partir de una fotografía tomada del sistema y determinar así si existe una mayor o menor hidrofiliidad (Conterno y Pazos, 2003). Dado que el tejido sanguíneo interactúa con el implante de forma inmediata a la colocación, se sugiere que facilitar la interacción entre ambos podría favorecer el proceso de cicatrización y oseointegración (Corengia et al., 2003).

Otro de los tratamientos utilizados es el grabado o ataque ácido. Durante el mismo se suelen utilizar diversos tipos de soluciones tales como aquellas que contienen ácidos sulfúrico, clorhídrico, nítrico y fluorhídrico, o bien, combinaciones de estos compuestos (Pazos et al., 2004). Como consecuencia, la superficie tratada adquiere las irregularidades deseadas que favorecen el éxito del sistema implante – hueso nuevo (Parodi et al., 2004).

El anodizado también suele ser una técnica utilizada que consiste en formar una película de óxido sobre la superficie de titanio a través de un proceso electroquímico. El objetivo de esta película es incrementar la rugosidad superficial del material. Sumado a esto se ha evidenciado recientemente que las películas de óxido mejoran la formación de apatita en modelos de estudio que simulan fluidos corporales, siendo por este motivo, una técnica muy valorada (Shim et al., 2014).

II.2 Infecciones bucales

La causa principal de la pérdida de implantes y periimplantitis, es la infección generada por bacterias capaces de formar biopelículas de carácter periprotésico, crónicas y resistentes a métodos de tratamiento tradicional (McConda., 2016).

Generalmente, los microorganismos que dan lugar a la formación de estas biopelículas suelen provenir de la piel de los pacientes, de su sangre, de los trabajadores de la salud que intervienen en el proceso de colocación u otras fuentes contaminadas presentes en el entorno durante la intervención (Donlan, 2001). Además, numerosos estudios sostienen que la morfología del implante, principalmente asociada a la textura, juega un rol primordial en el proceso de adhesión inicial (Bürgers et al., 2010). Otra de las variables a tener en cuenta en relación a las biopelículas orales, es que la saliva es un mediador indispensable que permite la colonización y adhesión de las especies pioneras, para que estas luego den lugar a una segunda partida de especies colonizadoras (Fröjd et al., 2011).

Las primeras observaciones de las biopelículas orales se remontan a muchos años atrás, de la mano de Van Leeuwenhoek, quien logró visualizar a través de microscopios rudimentarios biopelículas bacterianas adheridas a las superficies dentarias. Sin embargo, fue necesario el desarrollo de la microscopía electrónica para conocer en detalle la estructura de estas comunidades microscópicas (Donlan, 2002).

La unión de las bacterias a los dispositivos se produce a partir de dos etapas biofísicamente distintas. La adhesión inicial se debe a la interacción de fuerzas inespecíficas con la superficie celular y se encuentra mediada por factores como la polaridad, fuerzas de London van-der Waals e interacciones hidrofóbicas (Veerachamy et al., 2014; Aguayo et al., 2015). En una segunda instancia, se produce la contribución de interacciones de tipo secundarias representadas por una unión específica. En esta instancia ya resulta irreversible la unión celular y la erradicación de microorganismos solamente puede llevarse a cabo mediante la acción química o mecánica (Aguayo et al., 2015).

Ciertos estudios con cepas de *Enterococcus faecalis*, han demostrado que las biopelículas maduras (aproximadamente de 6 semanas de incubación), manifiestan signos de mineralización, motivo por el cual resulta más dificultosa la erradicación de

los mismos en una etapa de infección avanzada (Zand et al., 2014). De hecho, esta especie bacteriana tiene la capacidad de expresar resistencia mediada por su capacidad de producir biopelículas en conductos radiculares que han sido tratados con hidróxido de calcio, uno de los compuestos más utilizados en la descontaminación de intracanales (Evans et al., 2002). Asimismo, varias de sus cepas han demostrado resistencia a ciertos antibióticos, y se han asociado a patologías dentales e infecciones sistémicas (Tinoco et al., 2017). De hecho, muchos estudios sostienen que estas biopelículas reorganizan su arquitectura celular en respuesta al estrés que induce la exposición a este tipo de antimicrobianos (Dale et al., 2017). Si bien es una especie bacteriana que no se presenta como el ejemplar dominante en esta clase de enfermedades, sí se ha podido determinar que se encuentra presente en el 30-89% de los dientes con fracasos de tratamiento postendodóntico (Flanagan, 2017; Tinoco et al., 2017). Esto se debe principalmente a que la misma puede persistir en estado vegetativo en el hueso ya curado y adherirse al colágeno de tipo I del mismo (Flanagan, 2017). De esta manera, sobrevive en forma de monocultivo pudiendo reactivarse tras la colocación del implante dental. Finalmente puede producirse la colonización bacteriana del dispositivo, dando muchas veces como resultado la pérdida del mismo (Tinoco et al., 2017).

III. Terapia Fotodinámica

III.1 Generalidades

La Terapia Fotodinámica (TFD) consiste en combinar luz con un fotosensibilizante (FS), factores ambos inocuos *per se*, pero que en presencia de O₂ desencadenan un mecanismo citotóxico, el cual conduce a la muerte celular (Weishaupt et al., 1976).

Existen reportes de la utilización de terapias basadas en la exposición a la luz solar desde hace más de 3000 años. En el siglo XVIII comenzó a describirse de forma

sistemática el efecto de la luz solar sobre el raquitismo, y en 1903 Niels Finsen fue galardonado con el premio Nobel “en reconocimiento a su contribución al tratamiento de enfermedades, en particular lupus vulgaris, mediante radiación lumínica concentrada”. Posteriormente, en 1950, Richard Cremer introdujo la fototerapia como tratamiento contra la ictericia en neonatos. El uso de FS también puede rastrearse hasta la antigüedad, ya que diversas fuentes señalan la utilización de psoralenos para el tratamiento del vitiligo. Los primeros intentos de utilización de la TFD se deben al pionero de la fotobiología, Hermann von Tappeiner, quien además en 1904 introdujo el término en el tratamiento de tumores y enfermedades cutáneas mediante el uso de diversos colorantes, luego de que uno de sus estudiantes observara accidentalmente la fotosensibilización de cultivos de paramecios con naranja de acridina. No obstante la historia moderna de la TFD comienza en la década del `70 del siglo XX, con el descubrimiento realizado por Thomas Dougherty de la localización selectiva en el tejido tumoral de derivados de la hematoporfirina (HPD), moléculas capaces de inducir fotosensibilización, y el posterior desarrollo del FS comercial Photofrin (Moan et al., 2003).

III.2 Fotoinactivación bacteriana

Si bien el rol antimicrobiano de la TFD ya era conocido por von Tappeiner, el estudio de procedimientos de fotosensibilización bacteriana que permitan combatir infecciones con luz a través de un mecanismo fotodinámico, que se ha dado en llamar fotoinactivación bacteriana (FIB); ha sido postergado debido a diversos factores. Entre ellos, se destaca la confianza en el uso de antibióticos anterior a la actual emergencia de multi-resistencias, lo cual demoró el estudio de tratamientos alternativos y más eficientes, y el hecho de que las bacterias Gram negativas, así como ciertos protozoos en fase quística, responden de manera pobre a los FS tradicionales como la naranja de acridina y las porfirinas de carga negativa (Jori et al., 2006). En la Figura 4 se esquematizan las ventajas de la FIB los tratamientos de uso actual.

Ventajas de la FIB

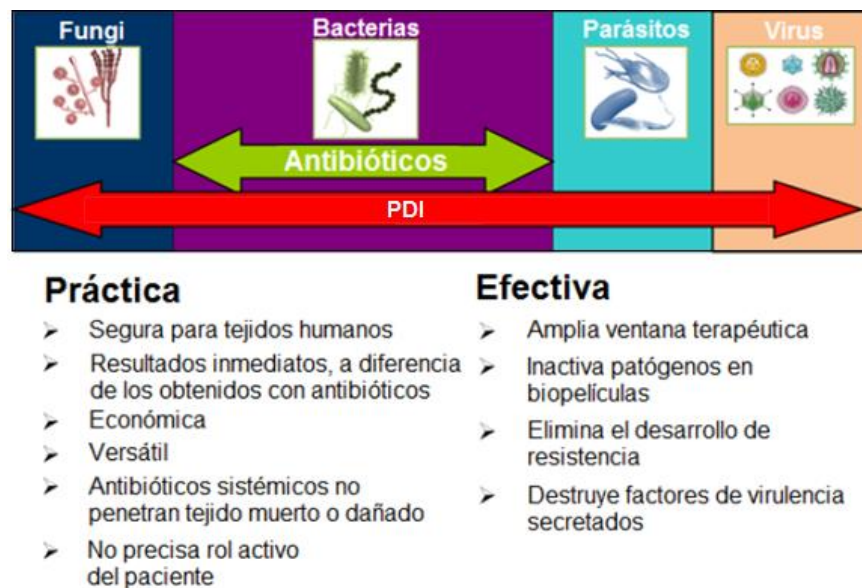


Figura 4: Ventajas de la FIB vs los tratamientos convencionales antibacterianos

Para el tratamiento de infecciones localizadas es preferible la aplicación tópica del FS, en lugar de administrarlo sistémicamente, ya que de esta manera se minimiza el daño a las células del hospedador. La FIB ha sido empleada recientemente para el tratamiento de infecciones orales, prótesis dentales (Saino et al., 2010), úlceras gástricas de origen bacteriano, acné vulgaris, infecciones cerebrales derivadas de craneotomías e infecciones en quemaduras y se ha sugerido su uso para el tratamiento de catéteres colonizados (Perni et al., 2011) o diversas infecciones asociadas a traumas, como gangrena de Fournier, celulitis necrotizante, etc. (Demidova et al., 2004). Además, existen reportes de neutralización de factores de virulencia como consecuencia del tratamiento mediante FIB, que de otra forma persistirían incluso luego de la eliminación de la bacteria (Bhatti et al., 2001).

Hasta el momento no se han reportado casos de aparición de cepas resistentes a la FIB, y no es probable que ocurra debido a que es una terapia que tiene blancos múltiples, que dependen de la localización celular del FS es donde se produce el estrés oxidativo. Al mismo tiempo, se ha reportado que la multi-resistencia frente a

antibióticos en principio sería un factor completamente independiente de la sensibilidad frente al tratamiento fotodinámico (Demidova et al., 2004).

La creciente amenaza de resistencia microbiana ha puesto de relieve a la FIB un tratamiento alternativo prometedor para infecciones localizadas y superficiales (Cieplik et al., 2014). Actualmente, en muchos países la FIB es una terapia complementaria aprobada para el tratamiento de enfermedad periodontal, infecciones dentales y úlceras de piernas infectadas. Tiene el potencial para convertirse en un futuro próximo en una terapia estándar para enfermedades infecciosas localizadas y superficiales. De esta manera, los agentes sistémicos efectivos podrían ser reservados para infecciones más amenazantes para la vida, bajando la alta tasa de resistencia bacteriana a antibióticos, que día a día aumenta.

Se ha reportado que una serie de bacterias se han tratado con FIB, utilizando ácido 5-aminolevulínico (ALA) como generador endógeno de porfirinas las cuales actúan como FS, utilizándose además clínicamente especialmente en la piel, en acné, folliculitis crónica, rosácea, liquen escleroso y lesiones cutáneas asociadas con *Mycobacterium Marinum* (Harris et al., 2012). En modelos *in vivo* de rata, la FIB mediada por ALA (ALA-FIB) también se ha empleado para el tratamiento de la osteomielitis en una infección por *S. aureus* (Bisland et al., 2007). En seres humanos, el uso de la FIB se limita a las infecciones bacterianas que son accesibles a la administración local tanto del fármaco como de la luz, incluyendo la piel, los pulmones, la cavidad oral, el área urogenital y el tracto gastrointestinal (Fotinos et al., 2008). Como ejemplo, los primeros ensayos clínicos han demostrado resultados prometedores de la ALA-FIB como terapia antimicrobiana contra *Helicobacter pylori* (Wilder-Smith et al., 2002). En la actualidad, aún no se ha elucidado en qué medida ALA-FIB aplicado a infecciones dermatológicas logra su éxito clínico por matar los microorganismos reales responsables de la infección o por en qué eliminar las células o tejidos hospedadores que albergan los microbios infecciosos (Harris).

Por otro lado, existen numerosos trabajos que posicionan a la FIB como una satisfactoria terapia alternativa que permite erradicar microorganismos asociados a infecciones odontológicas (Mang et al., 2016). De hecho, una alternativa que permite descontaminar implantes dentales, es la asociación de un tratamiento tradicional con FIB (Marotti et al., 2013).

Entre otros trabajos, Cho et al., (2015) lograron reducir de manera significativa bacterias anaeróbicas causantes de periimplantitis, adheridas a distintas superficies de titanio usando como fotosensibilizante a la eritrosina y un como fuente de luz un diodo emisor de luz verde. Por otro lado, también se realizó la FIB en presencia de 2,5% NaOCl, resultando en un tratamiento efectivo en la erradicación de *Enterococcus faecalis* presente en enfermedades de encías, lo que evidencia la importancia de la combinación de tratamientos (Zand et al., 2014).

Mediante FIB puede ser tratado clínicamente a un amplio espectro de infecciones localizadas (Figura 5). Los estudios fotodinámicos *in vitro* han sido realizados en modelos que mimetizan el microambiente de la posible infección clínica, encontrándose ensayos en modelos celulares o proteicos, modelos en sangre, modelos en piel. Sin embargo, los modelos *in vivo* se asemejan más a la infección real, realizándose ensayos en modelos animales donde se simulan infecciones en heridas, infecciones bucales o dentales, leishmaniasis, infecciones por micobacterias, otitis u osteomielitis (Tim, 2015).

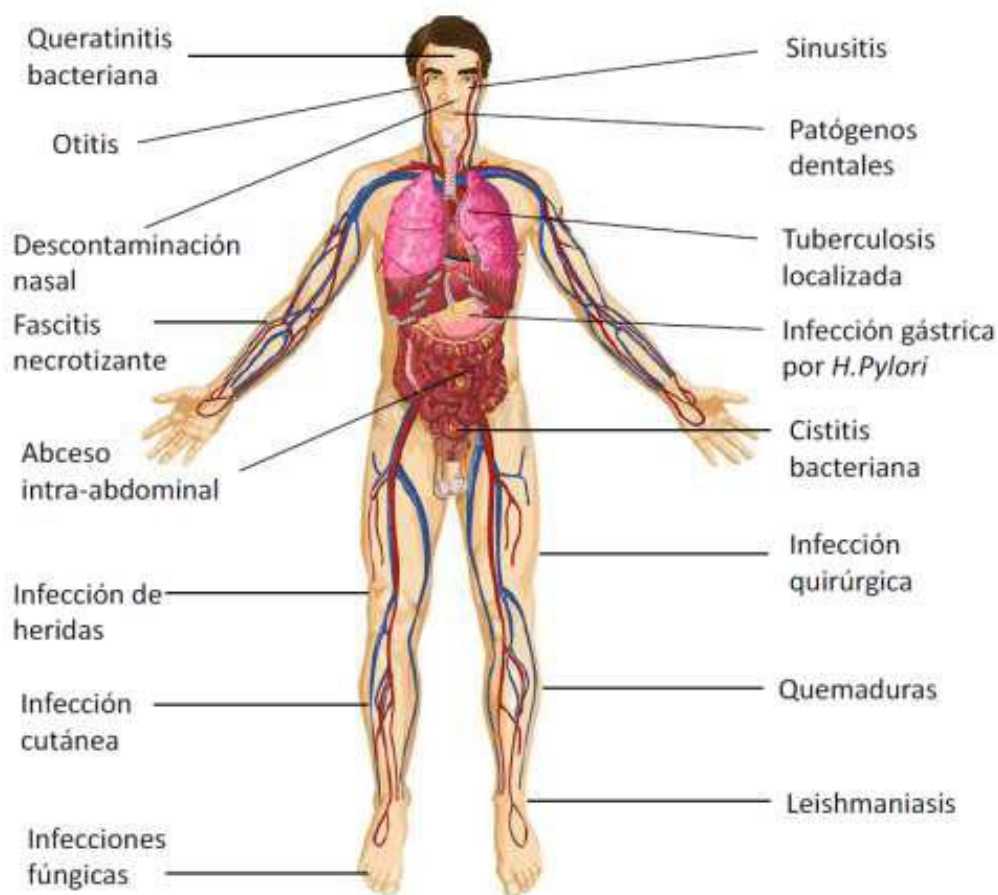


Figura 5. Infecciones que podrían combatirse mediante la FIB

III.2.1 Mecanismos de daño por FIB

Los FS utilizados en FIB son moléculas cuyos electrones de capas superiores (Figura 6) son capaces de excitarse desde un estado basal (S_0) hasta un primer estado singlete excitado (S_1) a través de la estimulación con luz visible, desde el cual a su vez pueden decaer por cruzamiento inter-sistema hasta un estado triplete (T_1). Al tratarse de una transición prohibida por el principio de Franck-Condon, el pasaje del electrón desde o hacia el estado T_1 está desfavorecido cuánticamente, pero su vida media es lo suficientemente larga como para permitirle interactuar con moléculas del entorno.

El FS en T1 puede reaccionar de dos maneras relevantes para la FIB, definidas como mecanismos de Tipo I o Tipo II. El mecanismo de Tipo I consiste en la transferencia electrónica hacia un sustrato biológico, convirtiéndolo en un radical libre, el cual a su vez reaccionará con O₂ para generar radicales libres del oxígeno (ROS) que propaguen el daño celular. Alternativamente el mecanismo de Tipo II se caracteriza por un intercambio del espín electrónico entre el FS y el O₂. La energía es transferida desde el FS en el estado T1 hacia el O₂, cuyo estado basal es el triplete, para convertirlo en oxígeno singlete (¹O₂), altamente reactivo (Sharman et al., 1999). Luego de la transferencia energética el FS retorna al S0, pudiendo absorber un nuevo fotón, de forma que el proceso se repetirá hasta que sea degradado finalmente debido al efecto de la luz (foto-degradación o “photobleaching”).

De lo anterior, entonces, se desprende que para obtener un efecto fotodinámico eficiente, debe existir cierta disponibilidad de O₂ molecular tal que permita la generación de ¹O₂ de forma continua durante la irradiación. La depleción de O₂ molecular, que puede ocurrir al irradiar con una fluencia elevada, limita así la efectividad de la FIB. De esta manera, los prerequisites para obtener un efecto fotodinámico óptimo (Pervaiz y Olivo, 2006) son:

- Concentración ideal del FS
- Suficiente disponibilidad de O₂ molecular
- Irradiación con fluencias que permitan la reposición del O₂ molecular en el sitio tratado.

Las diversas propiedades ópticas de los tejidos, como la penetración de la luz empleada para irradiar o la intensidad lumínica que puede utilizarse sin provocar efectos térmicos, también afectan la eficiencia de la FIB. La penetración de la luz en los tejidos está limitada por los fenómenos de dispersión y absorción, predominando el primero excepto en tejidos muy pigmentados (Pervaiz y Olivo et al., 2006).

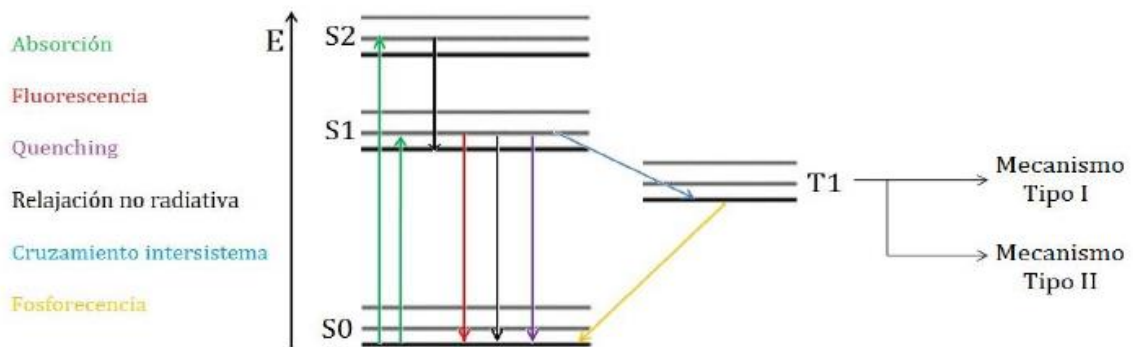


Figura 6: Diagrama de Jablonski. Eventos foto-físicos vinculados a la excitación electrónica como consecuencia de la absorción de un fotón. El estado triplete conduce a la muerte celular por daño oxidativo a través de un mecanismo Tipo I o Tipo II.

Hay dos mecanismos básicos que han sido propuestos para dar cuenta del daño letal provocado en las bacterias mediante la FIB: daño a la membrana citoplasmática, seguido de fuga del contenido celular al medio externo, con inactivación de enzimas y mecanismos de transporte de membrana, y daño directo al ADN. La importancia relativa de cada mecanismo en la mortalidad bacteriana ha sido discutida extensamente en la bibliografía (Hamblin et al., 2004). Se conoce que la FIB mediada por diversos tipos de FS induce rupturas en ADN simple y doble cadena, así como la desaparición consecuente de la fracción de ADN plasmídico superenrollado, tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas (Fiel et al., 1981). El daño al ADN sería más frecuente al utilizar FS capaces de actuar como intercalantes, siendo los residuos de guanina, los más susceptibles de oxidación (Hass y Webb, 1979). Sin embargo, si bien el daño al ADN provocado por la FIB efectivamente ocurre, aparentemente la causa primaria de muerte bacteriana correspondería al compromiso de la integridad de la membrana plasmática, como se deduce del hecho de que *Deinococcus radiodurans*, cuyo mecanismo de reparación de ADN es sumamente eficiente, es una especie particularmente susceptible de ser foto-inactivada (Schafer et al., 1998). El daño a la membrana plasmática involucraría la alteración de proteínas de membrana, perturbación del proceso de síntesis de la pared celular, y la aparición de una estructura multilaminar cercana al septum de células en división, junto con la

pérdida de iones K^+ del interior celular (Nitzan et al., 1992). En células de mamíferos el mayor daño oxidativo luego del tratamiento fotodinámico se observa principalmente en mitocondrias y/o membrana plasmática y en menor medida en lisosomas, dependiendo del tipo de FS utilizado.

III.2.2 Fotosensibilizantes

Las características de los FS cumplen un rol preponderante en la eficiencia del protocolo de fotoinactivación. Este debe poseer ciertas características: debe tratarse de un compuesto puro de composición constante; idealmente no debe ser tóxico en oscuridad, debe acumularse de forma selectiva en el sitio a irradiar, y en caso de ser metabolizado por el hospedador, el cuerpo debe ser capaz de eliminarlo rápidamente para evitar fotosensibilización cutánea. Además, el FS debe poseer un relativamente elevado rendimiento cuántico para el decaimiento hacia el estado triplete, cuyo estado energético debe ser mayor que el del oxígeno singlete (1O_2), y debe ser capaz de transferir energía hacia el O_2 molecular para generar 1O_2 . Dado que la agregación disminuye el rendimiento cuántico del decaimiento hacia T1 y de formación de 1O_2 , el FS no debería agregarse.

Las propiedades de absorción lumínica también poseen un rol central en la elección del FS, en particular para donde se busca foto-sensibilizar tejidos (Nyman et al., 2004). La luz de mayor longitud de onda penetra más fácilmente en tejidos a irradiar, sin embargo un FS capaz de absorber luz de longitudes de onda altas generará un estado T1 de baja energía, que puede llegar a ser insuficiente para la formación de 1O_2 . Los FS que absorben luz de elevada longitud de onda, además, son más propensos a sufrir procesos de foto-degradación, aunque esta característica puede resultar ventajosa ya que reduce la persistencia de la fotosensibilización luego de la terapia. Por otro lado, los FS que absorben a bajas longitudes de onda traen aparejada la ventaja de necesitar una menor dosis de FS, pero a su vez disminuye la penetración lumínica, reduciendo el efecto terapéutico.

Además es deseable que un FS sólo absorba débilmente luz perteneciente a la región comprendida entre 400 - 600 nm, ya que varios componentes de los sistemas biológicos, como el pigmento melanina que protege de la radiación solar, o la hemoglobina, presentan bandas de absorción en esta región, por lo que es posible que la irradiación induzca sensibilidad cutánea durante el tratamiento. Considerando ambos factores, los FS deberían absorber luz perteneciente a la región comprendida entre los 600 - 1000 nm, por lo que se denomina a esta región “ventana terapéutica”. En cambio, para la FIB aplicada a células bacterianas directamente, por ejemplo sobre diferentes sustratos como lo son las prótesis o los implantes, es posible utilizar otro tipo de moléculas, con máximos de absorción en longitudes de onda menores a 600 nm.

Por último, idealmente la síntesis del FS debe ser simple, y debe ser posible producirlo en gran escala, de forma que el precio de la droga se mantenga bajo, garantizando así una amplia utilización (Wainwright et al., 1996, Nyman y Hynninen, 2003).

Distintos FS interactúan sobre el patógeno de distinta manera, distinguiéndose en base a esta característica tres clases de FS principales (Demidova et al., 2005): a) aquéllos que se unen fuertemente a la pared celular y son incorporados al interior del microorganismo, como el conjugado poli-L-lisina clorina (e6); b) los que se unen débilmente a la bacteria de forma que la producción extracelular de ROS cumple un rol importante, como el FS catiónico azul de Toluidina, y c) el grupo de FS como el Rosa de Bengala, que no se unen a la superficie del patógeno de manera que la eficiencia depende de la formación de $^1\text{O}_2$ extracelular.

Es un hecho demostrado que debido a las diferencias estructurales que caracterizan a ambos grupos, las bacterias Gram positivas son más sensibles a la TFD que las Gram negativas (Figura 1), ya que la barrera de múltiples capas (glicocálix, lipopolisacáridos, bicapa lipídica externa, etc.) que constituye la superficie externa de

las bacterias Gram negativas supondrían un impedimento para el ingreso del FS (Demidova et al., 2004). Así, el tratamiento de bacterias Gram negativas mediante FIB puede combinarse con diversas técnicas que aumenten la permeabilidad de la pared externa, como por ejemplo la inducción de un desequilibrio electrostático en esta estructura mediante el quelado de metales divalentes utilizando ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) lo cual conduce a una desorganización de la pared como consecuencia de la repulsión entre las cargas negativas de elementos estructurales.

Los FS catiónicos a valores de pH fisiológicos, tales como fenotiazinas, ftalocianinas o porfirinas, pueden, no obstante, unirse a la superficie tanto de bacterias Gram positivas como Gram negativas, desplazando a los metales divalentes que estabilizan las cargas negativas estructurales presentes en la superficie externa, ya que poseen constantes de afinidad de 2 a 4 órdenes de magnitud mayores. Empleando este tipo de FS, es posible foto-inactivar bacterias Gram negativas sin necesidad de un tratamiento previo (Jori, 2006). Además, debido a su carácter anfipático, el mismo FS puede actuar como elemento de desorganización de la pared.

Se ha demostrado, también, que los FS catiónicos son especialmente eficientes en la erradicación de biopelículas de las bacterias Gram positivas *S. aureus* y *S. epidermidis* (Gad, 2004).

Los FS más ampliamente utilizados en la clínica son las fenotiacinas, moléculas planas, tricíclicas y aromáticas, presentando una carga intrínseca positiva y coloración azul, cuyo máximo de absorción se encuentra entre 600 y 680 nm. Entre ellas, se destacan principalmente el azul de metileno y el azul de toluidina. La Tabla 1 detalla algunos ejemplos de aplicación de estos FS y en qué países está autorizado su uso (Longo et al, 2011).

Tabla 1: Algunos FS antimicrobianos comercializados mundialmente (Longo et al, 2011).

FS	Infección tratada	País	Compañía comercializadora
Derivados fenotiacínicos	Enfermedad periodontal	Canadá	Periowave
Derivados fenotiacínicos	Infección dental	Alemania	Helbo
Azul de metileno	Infección dental	Brasil	Aptivalux
Derivados fenotiacínicos	Infección dental	Reino Unido	DenFotex
Derivados fenotiacínicos	Úlceras de pierna infectada	Reino Unido	Photopharmica

III.3 Búsqueda de nuevos FS

La actividad fotodinámica de ciertos componentes vegetales fue descripta por vez primera hace alrededor de cien años. El blanqueado de la ropa lavada en el césped posiblemente sea la aplicación práctica más temprana de la actividad fotodinámica, en este caso mediada por clorofila. Tanto esta porfirina como algunos de sus derivados se utilizan de hecho, como FS (Ebermann et al., 1996).

Otro grupo de constituyentes vegetales fotoactivos incluye a los poliacetilenos y los tiofenos. Estos últimos se derivan bio-sintéticamente de los poliacetilenos, y se los encuentra principalmente en plantas compuestas. Se conoce la actividad nematocida de los tiofenos, la cual se incrementa con la exposición a la luz, así como la capacidad de inducir fototoxicidad en la levadura patogénica *Candida albicans*. Las longitudes de onda de excitación para tiofenos se localizan entre los 300 y 400 nm. Los poliacetilenos se encuentran presentes en diversas familias vegetales e incluso en algunos hongos.

La fenilheptatrina, por ejemplo, no se intercala en el ADN, pero presenta actividad fototóxica contra diversas especies bacterianas, hongos, algas, fibroblastos humanos, larvas de insectos, peces, etc.; sin embargo algunos poliacetilenos exhiben también toxicidad en oscuridad (Ebermann et al., 1996).

Entre otros grupos dignos de mención se encuentran las quinonas y, aún más relevante, las antraquinonas como fagopirina e hipericina (Ebermann et al., 1996). La fagopirina puede extraerse de flores del trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), y puede utilizarse como FS con longitudes de onda de excitación entre los 540 y 610 nm. La hipericina se aisló de extractos de la especie *Hypericum perforatum*, a partir del descubrimiento de que el consumo de esta planta por parte del ganado provoca su fotosensibilización, generando en estos animales dermatitis y ceguera (Agostinis et al., 2002). La misma se ha investigado para su posible uso en la esterilización de sangre y el tratamiento del SIDA u otras infecciones virales.

Los derivados del 9-metoxipsoraleno, como las furanocumarinas presentes en una enorme variedad de plantas incluyendo *Apium graveolens*, *Petroselinum sativum*, o *Angelica archangelica*, son compuestos que presentan una elevada actividad fotosensibilizante, cuyos máximos de absorción se localizan en el rango del UV cercano, entre 320 y 360 nm (Ebermann et al., 1996).

Para mejorar las propiedades de absorción y/o selectividad y minimizar la toxicidad sistémica de los FS naturales, estos suelen derivatizarse o conjugarse con otras moléculas. Un ejemplo lo constituye la clorina que suele conjugarse con aminoácidos o anticuerpos.

La búsqueda de nuevos FS, la modificación química de los actualmente utilizados o su modo de vehiculización, son motivos de constante estudio en la fotoquímica y en la fotobiología, con el fin de conocer algunas de las publicaciones recientes relacionadas con nuevos FS destinados a diferentes aplicaciones, es posible mencionar a Caruso et al (2017) presentando FS pertenecientes a la familia de boron-dipirrometenos en presencia de poliamidoaminas para su utilización FIB, a Hodgkinson et al. (2017) quienes propusieron unas nuevas ftalocianinas de Zn sulfonadas para su uso en TFD y a Postigo et al (2017) quienes reportaron al *Porophyllum obscurum* como alternativa de antifúngica en el tratamiento de candidiasis orofaríngea; entre otros. El

uso de nanopartículas para optimizar la respuesta a la terapia también es motivo investigación en este área (Abrahamse y Hamblin, 2016).

III.3.1 Las porfirinas como FS

En 1942, Auler y Banzer ya habían observado la particular afinidad de la Hematoporfirina por el tejido neoplásico, confirmada más tarde por Figge et al. (1948) quienes describieron la fluorescencia de las porfirinas acumuladas en el tumor cuando se las iluminaba con la lámpara de Wood.

En la década del `50 Schwartz et al. (1955) propusieron que la fluorescencia selectiva del tejido maligno luego de la administración sistémica de la Hematoporfirina, podría deberse a impurezas en la preparación y no a la Hematoporfirina misma. Luego, se mejoró la localización del FS mediante acetilación y posterior reducción de la preparación cruda (Lipson et al., 1961). La mezcla obtenida por este procedimiento se llamó Derivado de Hematoporfirina (HpD). El hallazgo del HpD como un efectivo FS tumoral y el posterior desarrollo de equipos láser adecuados y sistemas ópticos de transmisión de la luz, llevaron al desarrollo de la TFD durante la década del `70. Desde ese momento, ha habido un creciente interés en esta nueva terapia, con una gran cantidad de estudios clínicos.

El HpD desarrollado por Lipson, es una mezcla compleja de varias especies de porfirinas, algunas de las cuales son menos eficientes *in vivo* como FS tumorales (Dougherty et al., 1984). Mediante el uso de tamices moleculares se logró aislar una fracción enriquecida en las especies responsables de las propiedades FS del HpD (Dougherty et al., 1984). Esta fracción activa es identificada como porfímero de sodio (Photofrin II, QLT Inc., Vancouver, Canadá y Laboratorios Lederle, Pearl River, NY, USA) y se cree que es una mezcla agregada de trímeros/oligómeros de porfirinas unidas por puentes de éter (Dougherty, 1987b; Kessel et al., 1987; Dougherty & Marcus, 1992). Actualmente este producto es usado para la TFD clínica, y ha sido aprobado por la FDA de Estados Unidos.

Si bien las porfirinas actualmente son autorizadas para su uso en oncología, existen reportes que la proponen como FS en tratamientos antifúngicos (Davies et al., 2016; Ramos et al., 2016) y antibacterianos (Le Ghern et al., 2017; Masiera et al., 2017).

III.3.1.1 Fotoquímica de las Porfirinas

Las porfirinas muestran una intensa absorción en la región azul alrededor de los 400 nm, llamada banda de Soret, y cuatro bandas adicionales de absorción con intensidades decrecientes entre los 500 y 650 nm (Figura 7). Como la penetración de la luz en los tejidos aumenta a mayores longitudes de onda (Van Gemert et al., 1985; Wilson, 1989) generalmente se usa la banda de absorción más débil que es la de 630 nm para iluminar los tejidos sensibilizados con el Photofrin (Gomer et al., 1984), aunque recientemente se vio que con una luz de 635 nm de longitud de onda se obtendría una mayor actividad biológica (Star et al., 1990).

Sin embargo, para su utilización en FIB sobre implantes o prótesis, no existe la limitación de la penetración a los tejidos, pudiéndose aprovechar el máximo de absorción en beneficio de su actividad antimicrobiana.

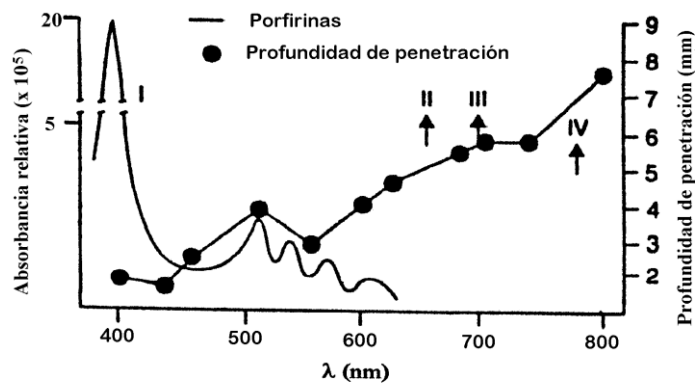


Figura 7: Espectro típico de absorción de las porfirinas y profundidad de penetración en la piel. La figura representa el espectro de absorción de porfirinas tales como el Photofrin y la PROTO IX (I) y la penetración relativa de la luz en músculo bovino versus la longitud de onda. Las flechas indican varios picos de absorción de fotosensibilizantes de segunda generación tales como las ftalocianinas y clorinas (II), ftalocianinas, purpurinas, verdinas y derivados de benzoporfirinas (III) y bacterioclorina A (IV).

III.3.1.2 Porphirinas sintéticas: TAPP

La pared celular de las bacterias Gram positivas tienen una carga negativa total debido a la presencia de los enlaces de fosfodiéster entre los monómeros del ácido teicoico; y la membrana externa de las Gram negativas, contienen lipopolisacáridos con una naturaleza altamente cargada, confiriendo carga negativa total a la pared.

La porfirina 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N-dimetilaminopropoxi)fenil]porfirina (TAPP) es una porfirina catiónica meso-sustituida, por lo cual poseería afinidad por la pared celular o la membrana externa de las bacterias. Además, es un ejemplo de FS moderno y de origen sintético. En la Figura 8 (A y B) se describen la estructura molecular de TAPP y el espectro de absorción de la misma.

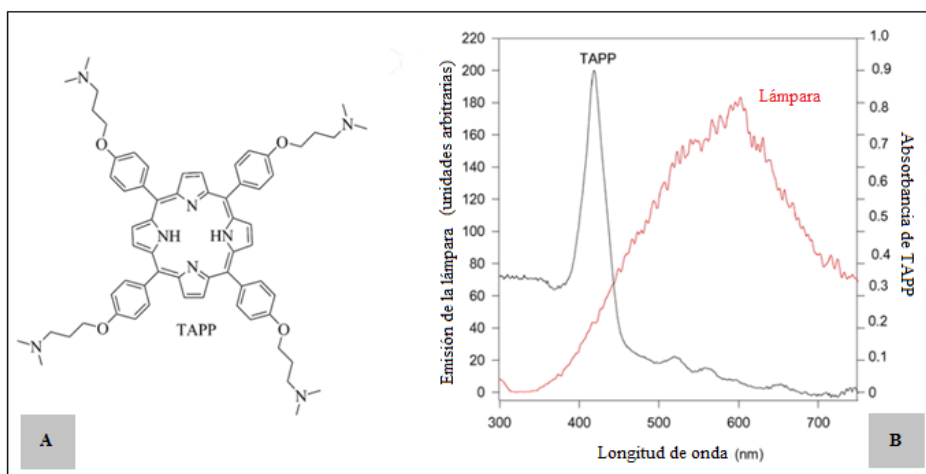


Figura 8. (A) Estructura química de la porfirina catiónica TAPP. (B) Espectro de absorción de TAPP en PBS y espectro de emisión de la lámpara halógena empleada en la irradiación.

II.3.1.3 ALA como precursor de porfirinas

El ácido 5-aminolevulínico (ALA) es un aminoácido, que se sintetiza a partir de glicina y succinil-CoA mediante la acción de la ALA sintasa en las mitocondrias humanas

y a partir de glutamato en bacterias. Es el primer compuesto en la vía de síntesis de porfirinas (Figura 9). Los porfirinógenos sintetizados son luego reducidos para obtener las porfirinas correspondientes.

En el caso de los seres humanos, la vía de síntesis finaliza en la Protoporfirina IX para a la que luego se le inserta una molécula de hierro para formar el grupo prostético hemo, pero en bacterias el metabolismo no se encuentra aún dilucidado. La Protoporfirinas IX es el FS más activo en células mamíferas, pero en bacterias Gram postitias y muchas Gram negativas, la biosíntesis no llega hasta esta porfirina. Las bacterias presentan distintos patrones de porfirinas sintetizadas a partir del precursor ALA, y estos patrones parecerían ser especie y cepa dependientes (Fotinos et al., 2008, Nitzan et al., 2004). La lipofilicidad de las porfirinas pareciera ser un factor importante en la eficiencia de la FIB y la acumulación intracelular de las porfirinas en bacterias, siendo el orden de lipofilicidad el siguiente: Uroporfirina < Coproporfirina < Protoporfirina.

Este compuesto ya es utilizado para el tratamiento de algunos tipos de cáncer, siendo ALA precursor de porfirinas fotosensibilizadas por medio de la TFD. El compuesto se encuentra aprobado por la Administración de medicamentos y Alimentos del gobierno de EEUU (FDA).

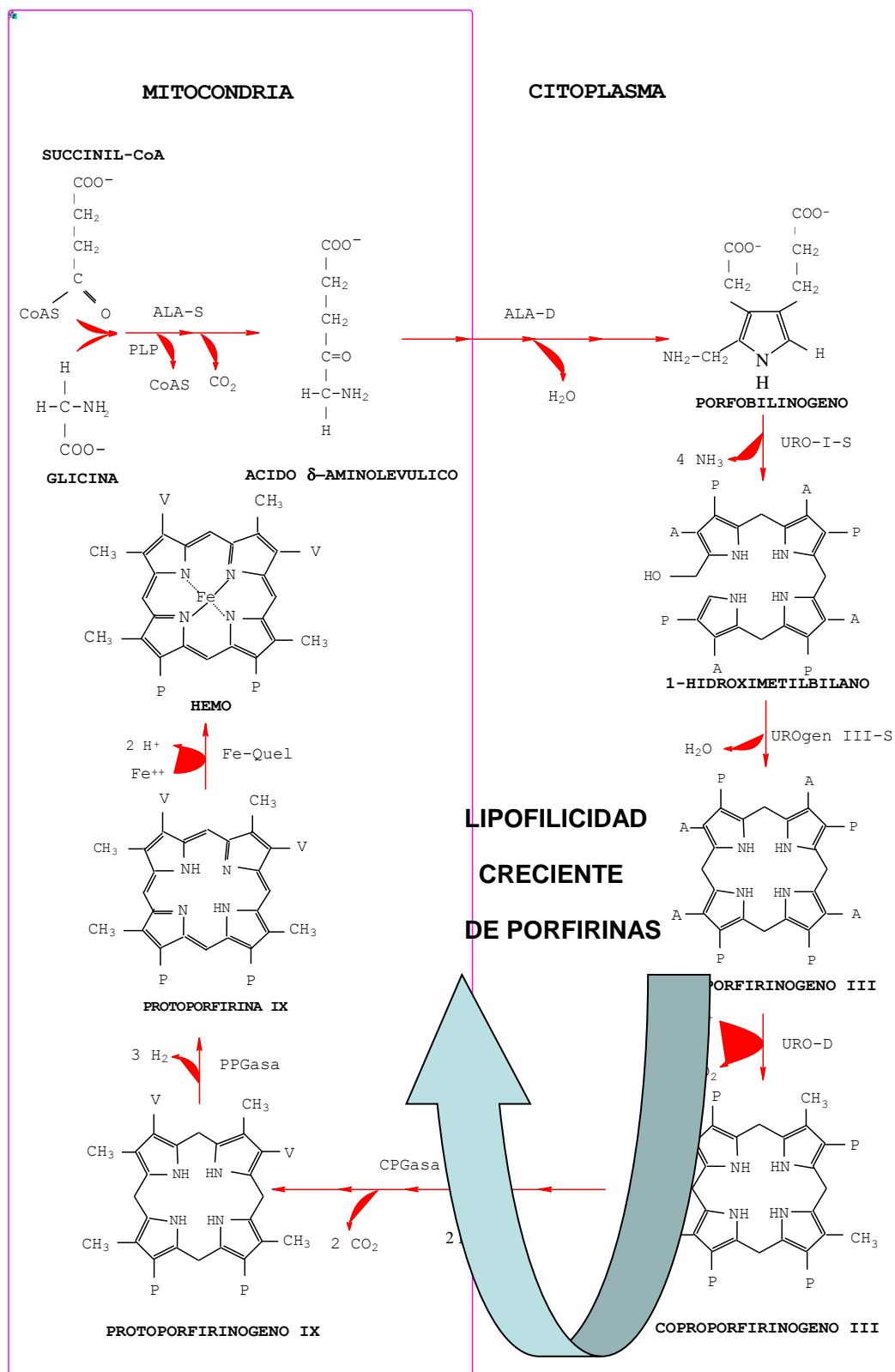


Figura 9. Ruta metabólica de síntesis de porfirinas a partir del ácido 5-aminolevulínico en células de mamífero

III.4 Fuentes de luz

En los comienzos de la TFD se utilizaban como fuentes lumínicas lámparas convencionales por motivos de seguridad, costos, facilidad de uso y conveniencia para ciertos FS. La luz blanca de amplio espectro suministrada por estas lámparas era convertida en luz monocromática mediante el uso de filtros ópticos. Sin embargo, el uso de este tipo de lámparas presenta ciertas desventajas, como la baja intensidad lumínica, el efecto térmico, y la dificultad de controlar la dosis lumínica, por lo que han sido progresivamente desplazadas por fuentes alternativas. Estas incluyen los diodos emisores de luz (LED), que suministran luz de alta energía y pueden disponerse en arreglos de tamaños y geometrías diversas, y dispositivos láser, los cuales emiten luz de alta energía y estrecho ancho de banda, que además pueden combinarse con fibras ópticas de forma de suministrar la luz de forma precisa sobre el tejido o sitio de infección (Pervaiz y Olivo, 2006). De todos modos, ningún tipo de fuente es intrínsecamente superior para todos los casos, por lo que la elección de la fuente lumínica apropiada dependerá de la dosis lumínica a suministrar, del tipo de FS empleado, y de la localización del tejido o sitio a irradiar.

La palabra láser es un acrónimo para Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, que refiere a dispositivos capaces de producir o amplificar radiación electromagnética a través de un proceso de estimulación controlada de la emisión, de acuerdo al estándar IEC60601 para equipamiento médico eléctrico. La luz láser posee dos propiedades características: un rango de longitudes de onda muy estrecho, y un alto nivel de coherencia (relación de fases constante).

Los primeros láseres de uso comercial para aplicación clínica fueron los equipos de He-Ne. Sin embargo, la potencia limitada de estos dispositivos condujo al desarrollo de sistemas más modernos, como los de arreglo de diodos, que emiten típicamente a 808, 940 ó 980 nm. Su tamaño manejable y costo accesible los ha convertido en instrumentos populares para diversos fines clínicos (Qadri et al., 2010). La posibilidad de los equipos láser de emitir luz con elevada potencia permite reducir los tiempos de irradiación necesarios para suministrar la dosis lumínica deseada.

Como se trata de luz monocromática, la elección del equipo a utilizar se torna crucial, ya que debe coincidir con algún máximo de absorción del FS utilizado. De esta forma, un determinado sistema láser solamente podrá emplearse con una cantidad limitada de FS. Por otro lado, las lámparas convencionales emiten luz de espectro amplio e irradiancias reducidas y además la utilización de estas lámparas no trae aparejado un aumento dramático en el tiempo de irradiación requerido, ya que la mayoría de los investigadores mantienen la fluencia en valores relativamente bajos para evitar efectos térmicos. El amplio espectro de emisión de estos dispositivos permite que sean empleados para un gran rango de FS que presenten distintos máximos de absorción (Brancaleon y Moseley, 2002).

En la actualidad los dispositivos láser constituyen la única manera de irradiar sitios donde sólo es posible acceder mediante arreglos de fibras ópticas, debido a la calidad del haz y la potencia de salida obtenida en estos equipos. La utilización de difusores de luz de distintas formas junto con microlentes, permiten generar haces colimados uniformes, que tornan adecuados a estos dispositivos para la iluminación directa de sitios accesibles (piel, cavidad oral, etc.). Las lámparas convencionales, en cambio, no pueden ser acopladas a fibras ópticas, pero es posible, no obstante, acoplarlas a guías ópticas líquidas que permiten suministrar la luz de forma precisa, en haces de entre 5 y 10 mm de diámetro, por lo que considerando su menor costo y complejidad, estos sistemas pueden ser preferibles en determinadas situaciones a los dispositivos láser (Brancaleon y Moseley, 2002).

En los últimos años el desarrollo de los LEDs ha posibilitado su utilización en el campo de la TFD. Estos sistemas ofrecen varias ventajas para el uso en investigación y en clínica. Las longitudes de onda de emisión en estos equipos abarcan desde el UVA (350 nm) hasta el infrarrojo cercano (1100 nm), con un ancho de banda de 5 a 10 nm y potencias de salida de, por el momento, hasta 150 mW/cm^2 (lo cual puede ser un limitante para sus aplicaciones en TFD) en un área de aproximadamente 20 cm^2 . Dos características relevantes a favor de la utilización de dispositivos LED en TFD son su

precio y versatilidad. Los LEDs son muy económicos, por lo cual es posible ensamblar arreglos que permitan irradiar grandes superficies, e incluso en geometrías particulares para la irradiación de diversas áreas anatómicas (Brancaleon y Moseley, 2002).

Otra fuente de luz propuesta para un tipo particular de TFD, denominada bifotónica, son los láseres de femtosegundos (Brancaleon y Moseley, 2002). Actualmente estos dispositivos se utilizan para excitación de dos fotones en diversa áreas de investigación (microscopía y espectroscopia). La excitación de dos fotones se basa en la observación que cuando la luz incidente se caracteriza por una elevada densidad de fotones, un cromóforo puede absorber de forma simultánea dos fotones de igual energía, excitando un electrón hacia un nivel energético equivalente a la suma de la energía sumada de los dos fotones absorbidos. Esto permite excitar al FS utilizando luz con una longitud de onda mayor a la de los picos de absorción de la molécula de interés. Sin embargo, para producir la densidad elevada de fotones, el láser debe emitir una gran cantidad de fotones en un pulso muy corto, que deben concentrarse en un volumen muy pequeño, características concordantes con las de los láseres de femtosegundos de estado sólido. Se ha demostrado que la excitación de dos fotones puede lograrse en tejidos tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, la principal ventaja de este tipo de TFD radicaría en la longitud de onda de excitación, ya que sería posible utilizar radiación incidente en el infrarrojo cercano, con mucha mayor penetración que la radiación visible. Por el momento existen, no obstante, algunos inconvenientes de tipo práctico tales como la necesidad de realizar barridos sucesivos sobre el área a irradiar, ya que considerando que la absorción de dos fotones ocurre en pequeños elementos de volumen, el tratamiento de un área en particular requiere de la aplicación del tratamiento en pequeñas regiones yuxtapuestas consecutivamente, prolongando el tiempo total del protocolo.

IV. Inactivación fototérmica

Recientemente se ha reportado el uso odontológico clínico de dispositivos láser de longitudes de onda pertenecientes al infrarrojo (por ejemplo, 980 nm) para el tratamiento de periodontitis, infecciones en implantes dentales (Gonçalves et al., 2010), descontaminación de implantes de titanio a partir de láseres de dióxido de carbono, ND:Yag, etc. (Kamel et al., 2014) o incluso fuera de este campo, para la remoción de tatuajes. Los cuadros de periimplantitis y periodontitis suelen ser revertidos con este tipo de dispositivos así como también las lesiones dentales traumáticas (Caprioglio et al., 2010; Marotti et al., 2017).

La utilización de estos láseres no debe encuadrarse dentro de los protocolos de la terapia fotodinámica, ya que emiten energía en la región no visible del espectro electromagnético y no involucran procesos fotodinámicos. El mecanismo de acción radica en que la luz en el infrarrojo cercano presenta alta penetración en los tejidos animales y calienta los tejidos, sobre todo su componente acuoso y pudiendo provocar fenómenos de inactivación bacteriana en zonas infectadas. Por otra parte, ciertos autores han presentado evidencia de que al combinar la terapia fototérmica con otros tratamientos, se obtiene un aumento en la capacidad de cicatrización tisular, posicionando a esta estrategia como una eficaz alternativa médica (Briceño et al., 2016).

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la respuesta a la Fotoinactivación bacteriana en distintas cepas Gram positivas y Gram negativas en crecimiento en estado planctónico y en biopelículas.

Objetivos específicos

-Inactivar bacterias Gram positivas y Gram negativas empleando la porfirinas sintética TAPP. Estudiar la incorporación de TAPP dentro de la célula y analizar el grado de inactivación por recuento de formación de colonias y por estudios de microscopía de fluorescencia y de barrido.

-Inactivar con TAPP biopelículas bacterianas de interés odontológico creciendo sobre placas de titanio con distintos recubrimientos y tratamientos diseñados para favorecer la osteointegración del titanio.

-Establecer los parámetros para el pre-tratamiento con Terapia Fototérmica con láser de 980 nm sobre biopelículas bacterianas, con el objetivo de desestabilizar la película para lograr una mayor eficiencia en el posterior tratamiento de Fotoinactivación.

- Aplicar la FIB sobre cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas empleando las porfirinas sintetizadas endógenamente a partir del pro-fotosensibilizante ALA.

-Establecer las condiciones de tiempo, concentración y dosis lumínica óptimas para llevar a cabo la FIB-ALA y estudiar la síntesis de porfirinas bajo esas distintas condiciones para cada las cepas bacterianas estudiadas. Relacionar la cantidad y tipo de porfirina con la respuesta a la FIB-ALA.

Materiales y Métodos

I. Reactivos

El ácido 5-aminolevulínico (ALA) se obtuvo de (Sigma Chem. Co, EE.UU.). Las soluciones de ALA realizaron en agua estéril. Los estándares de porfirinas se adquirieron de Frontier Scientific (Logan, UT). Todos los solventes y otros productos químicos fueron de calidad analítica y se usaron sin purificación adicional.

TAPP se sintetizó como fue previamente descrito por Caminos et al. (2005). Se prepararon soluciones iniciales en N,N-dimetilformamida (DMF) y luego se diluyeron antes de su uso en un buffer fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4. Esta porfirina fue proporcionada por el grupo del Dr. Durantini del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Río Cuarto y fue provista disuelta en DMF.

II. Placas de Titanio

Se emplearon cuatro placas de titanio (material empleado usualmente en implantes odontológico) comercialmente puro (Figura 10). Las mismas fueron diseñadas y proporcionadas por el Grupo Biomateriales del Centro de Investigación y Desarrollo en Mecánica del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI). Se describe brevemente el protocolo realizado para la obtención de cada una de ellas:

- Placa A: Anodizado a 10 V en fosfato monoácido 2%

El proceso de anodizado se llevó a cabo en una solución de fosfato monoácido de sodio al 2% en peso, a 30 V durante 30 seg.

- Placa B: Ataque ácido en solución %5 v/v HNO₃ (ácido nítrico).

Inicialmente las muestras recibieron un tratamiento de activación por inmersión mediado por una solución acuosa de HNO₃ (ácido nítrico) al 5% v/v, 0,5% v/v HF (ácido fluorhídrico) a 50°C durante 10 min. A continuación, las muestras se lavaron

durante un lapso de 10 min con ultrasonido en agua desionizada, con el objetivo de eliminar posibles trazas de ácido. Luego, se secaron en horno a 60°C por 1 h.

- Placa C: Desbaste con lija al agua (220, 400, 600)

Para lograr el desbaste las muestras fueron tratadas con papel de carburo de silicio (SiC) Posteriormente, las placas se limpiaron con series de ultrasonidos en acetona, alcohol y agua desionizada durante 10 min por etapa.

- Placa 4: Recubrimiento de Ca -P

Para obtener los recubrimientos se utilizó una solución concentrada de iones de calcio y fósforo (Ca-P) (Tabla 2). Las muestras de titanio se sumergieron en 1000 ml de dicha solución contenida en un vaso de precipitado. El vaso de precipitado se colocó en un baño de agua a 37°C durante 7 h con una velocidad de agitación de 80 rpm. El valor del pH se registró cada 15 min. Posteriormente, se extrajeron las muestras sumergidas y se lavaron ultrasónicamente en agua desionizada durante 10 min y luego se secaron en un horno a 60°C durante 1 h. Todas las muestras se pesaron antes y después del proceso de revestimiento.

Tabla 2. Componentes iónicos de la solución concentrada de Ca-P.

Ion	Na ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	HCO ₃ ⁻
Concentración (mM)	698	7,5	12,5	724,4	7,5	6

La esterilización de placas de titanio se realizó de la siguiente forma:

1. Incubación en hipoclorito de sodio 1/10 durante 1 hora.
2. Enjuague y limpieza mecánica con agua y papel absorbente.
3. Incubación en alcohol 70% durante 1 h.
4. Flameo y almacenamiento en placa estéril.

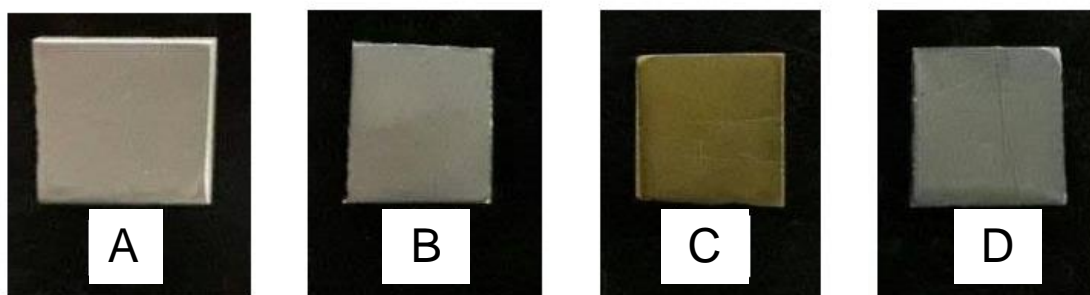


Figura 10. Fotografías de las placas de titanio con los distintos tratamientos. (A) Placa con superficie desbastada. (B) Superficie de titanio tratada con ataque ácido en solución. (C) Placa con anodizado externo. (D) Superficie de placa con cobertura de Ca y P.

III. Bacterias, medios y condiciones de cultivo

Se utilizaron aislamientos clínicos de *Staphylococcus epidermidis*, de *Enterococcus faecalis*, de *Escherichia coli* y de *Pseudomonas aeruginosa*. Además se usaron la cepa ATCC27853 de *P. aeruginosa* y las cepas ATCC25923 y RN6390 de *Staphylococcus aureus*. Para los ensayos de biopelículas sobre placas de titanio se utilizó la cepa de *E. faecalis* ATCC 29212, gentilmente proporcionada por la Dra. Laura Gliosca de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires.

Las bacterias se sembraron en agar tripteína de soja (TSA) (Laboratorios Britania S.A., Buenos Aires, Argentina) y se cultivaron en 5 ml de caldo tripteína de soja (TSB) a partir de una colonia de la cepa correspondiente. Se incubó durante 22 h a 37°C en agitación moderada (cultivo ON). A partir de este cultivo se generó un subcultivo fresco el día del experimento tanto para los ensayos en cultivo planctónico como para biopelículas.

IV. Cultivo planctónico

Para obtener el cultivo planctónico de trabajo en una fase sincronizada y exponencial del crecimiento, se inoculó el volumen de TSB necesario para cada experimento con una alícuota de un cultivo el cultivo ON, en una dilución 1/25. El cultivo se incubó a 37°C hasta llegar a la densidad óptica (DO) a 600nm deseada. Las células se cosecharon por centrifugación a 13.000 rpm durante 10 min a 4°C, se lavaron tres veces con PBS 10 mM pH 7,4 estéril y se suspendieron en el mismo buffer. Se realizaron los recuentos de las unidades formadoras de colonias (UFC)/ml por medio de siembra de alícuotas en placas de TSA. En los ensayos de FIB, se colocaron 500 µl/pocillo del cultivo planctónico en una placa de poliestireno de 24 pocillos estéril.

V. Formación de biopelículas

A partir de una dilución 1:1000 de un cultivo crecido a 37°C durante 22 h se inocularon 0,5 ml de esta suspensión en pocillos de placas de poliestireno estériles de 24 pocillos (Corning Costar). En el caso de los experimentos en donde las superficies de formación de las biopelículas fueron las placas de titanio o cubreobjetos (para ensayos de microscopía), estas se apoyaron en el interior de los pocillos y luego se añadió la suspensión bacteriana hasta cubrirla en su totalidad y permitir que la biopelícula se forme sobre las mismas luego de 24 hs de incubación estática a 37°C. Transcurrida la incubación, las biopelículas se lavaron con PBS y se reemplazó el medio en cada pocillo por 0,5 ml de PBS estéril a fin de llevar cabo los diferentes experimentos.

VI. Fotoinactivación bacteriana

Tanto los cultivos planctónicos como las biopelículas se incubaron a 37°C y en oscuridad en presencia del TAPP o ALA. Al cabo de diferentes tiempos, las placas se

iluminaron en presencia de TAPP o ALA empleando una fuente de luz no coherente. En el caso de las biopelículas, luego de la FIB, se lavaron con PBS y se levantaron de la superficie mediante el raspado con ansa y se suspendieron en 0,5 ml de PBS. Se homogeneizaron por medio de pipeteo sucesivos y agitación con vórtex.

Las bacterias viables se cuantificaron mediante siembra de una alícuota de diluciones en serie sobre placas de TSA. Transcurridas 24 h de incubación a 37° C, se determinaron las UFC/ml. Los siguientes tratamientos se establecieron como controles: i) bacterias tratadas con el FS pero no expuestas a la luz; ii) bacterias no tratadas con el FS expuestas a la luz; y iii) bacterias no tratadas con FS no expuestas a la luz.

VII. Fuente de luz para FIB

Luego de la puesta a punto con diferentes fuentes lumínicas, la fuente de iluminación elegida fue un arreglo de dos lámparas halógenas de tungsteno ELH colocadas en un reflector (500 W, General Electric Co., Cleveland, OH, EE.UU.) colocadas a 25 cm de distancia de la muestra, y refrigeradas por medio de filtros de agua (botellas de medio de cultivo con agua en su interior, la cual fue renovada cada 20 min) y ventilación continua, lo que proporcionó una potencia de luz homogénea de aproximadamente 23 mW/cm² en la superficie de la muestra medida con un medidor de potencia FieldMaster y un sensor PM10 (Coherent Inc., USA). Las mediciones de potencia se realizaron interponiendo los mismos filtros de agua con el fin de evitar la contribución infrarroja. Los controles en oscuridad se colocaron sobre el mismo sistema, pero envueltos en papel metalizado para evitar la incidencia lumínica.

VIII. Terapia fototérmica (láser 980 nm)

Para la terapia fototérmica se irradiaron las biopelículas con un láser diodo de 980 nm In Ga As P (Lumiia, Argentina) con una potencia máxima de 100 W empleada

en modo continuo. Las muestras fueron irradiadas desde la cara superior de los pocillos con un sistema de fibra óptica con foco ajustable, acoplado a una lente que permite la irradiación de un pocillo de una placa multiwell de poliestireno de 24 pocillos.

En el caso de las terapias combinadas de TAPP-FIB y terapia fototérmica, se incubaron biopelículas de *E. faecalis* crecida sobre placa de titanio, con TAPP (2,5 μ M) durante 60 min en oscuridad, luego fueron irradiadas con el láser de 980 nm durante 10 seg con distintas potencias lumínicas y posteriormente expuesta a la fuente de luz para FIB durante 2 h, dosis equivalente a 165 J/cm².

IX. Ensayo de unión/captación de TAPP por *S. aureus*

Para el ensayo de unión de TAPP a bacterias en cultivos planctónicos, se diluyeron en medio fresco cultivos ON de *S. aureus* y se crecieron hasta la fase exponencial media. Se emplearon 3 x 10⁸ UFC/ml. Para el ensayo de unión a biopelículas, se generaron biopelículas de 24 h como se detalló previamente. Se añadió TAPP a 1 ml de las suspensiones de bacterias o a las biopelículas para alcanzar concentraciones finales de 2,5; 10; 20 y 50 μ M. Se incubaron durante 10, 20 y 60 min a 37° C y posteriormente, los cultivos planctónicos o las biopelículas resuspendidas con pipeta, se centrifugaron durante 10 min a 13.000 rpm. Los sobrenadantes se descartaron y los pellets fueron lavados dos veces con PBS, se sonicaron, se agregó DMSO a temperatura ambiente para extraer el TAPP, se centrifugó nuevamente 10 min a 13.000 rpm y luego se cuantificó el TAPP en el sobrenadante por fluorescencia (exc 419 nm; em 660 nm) en un fluorómetro Perkin Elmer LS55 (Reino Unido). La concentración de TAPP se determinó mediante el uso de curvas estándar de fluorescencia vs concentración de TAPP disuelto en DMSO. Este valor fue relativizado a las UFC de cada cultivo, para determinar el número de fmoles de TAPP por UFC.

X. Extracción de porfirinas

La extracción de porfirinas sintetizadas a partir de ALA fue a partir de una modificación del método empleado por Cox y Charles (1971). Las porfirinas se extrajeron exhaustivamente de bacterias centrifugadas y del sobrenadante de cultivo. Las bacterias previamente centrifugadas se resuspendieron en acetato de etilo: ácido acético glacial (5:1, v/v) y se incubaron a 4°C durante 24 h en agitación. Los restos bacterianos se eliminaron de la mezcla de acetato de etilo y ácido acético glacial por centrifugación a 4°C. A continuación, se agitaron con un volumen igual de HCl 5%. Al definirse las dos fases de la mezcla, se separó la fase de HCl y se repitió la extracción, juntando las dos extracciones de HCl para la determinación de los espectros de fluorescencia, cuantificación de porfirinas y análisis por HPLC.

XI. Cuantificación de porfirinas a partir de ALA y espectros de fluorescencia

Las porfirinas de los cultivos bacterianos se extrajeron como se ha descrito anteriormente y se sometieron a determinación espectral de fluorescencia. Esta se realizó utilizando un espectrofluorómetro Perkin Elmer modelo LS55. La longitud de onda de excitación fue de 405 nm y la emisión se registró en el intervalo de 550-750 nm. Se utilizaron extracciones de los cultivos a tiempo cero como controles. Para la determinación de la cantidad de porfirinas por UFC, se tomaron los valores máximos de fluorescencia y se relativizaron a las UFC del inóculo estudiado.

XII. Cromatografía líquida de alta precisión fase reversa (RP-HPLC)

Las porfirinas se extrajeron de las bacterias y del sobrenadantes como se ha descrito previamente y se concentraron mediante cromatografía de intercambio iónico por el método de Doss y Schmidt (1971). Se utilizó RP-HPLC para el análisis de

las porfirinas usando el método descrito por De Matteis y Lim (1994). Las porfirinas se resolvieron en una columna Merck LiChrospher 100 RP-18 (diámetro interno de 125 mm y 4 mm, diámetro de partícula de 5 mm), volumen de inyección de 50 µl y se eluyeron con un buffer de acetato de amonio 1 M pH 5,16 (solvente A) y 100 % metanol (solvente B) con un gradiente lineal de 10% B (v/v) a 90% B (v/v) en 40 min; seguido de un gradiente lineal desde el 90% de B (v/v) hasta el 10% de B (v/v) durante otros 5 min, con un caudal de 1 ml/min. Las porfirinas se identificaron fluorométricamente (ex 400 nm, em 618 nm) utilizando como estándar de referencia una mezcla de Uroporfirina (Uro), porfirinas de ácido hepta (Hepta), hexa- (Hexa), penta (Penta) y meso-carboxílicos, Coproporfirina (Copro) y Protoporfirina (Proto) (Frontier Scientific, USA) (Figura 11).

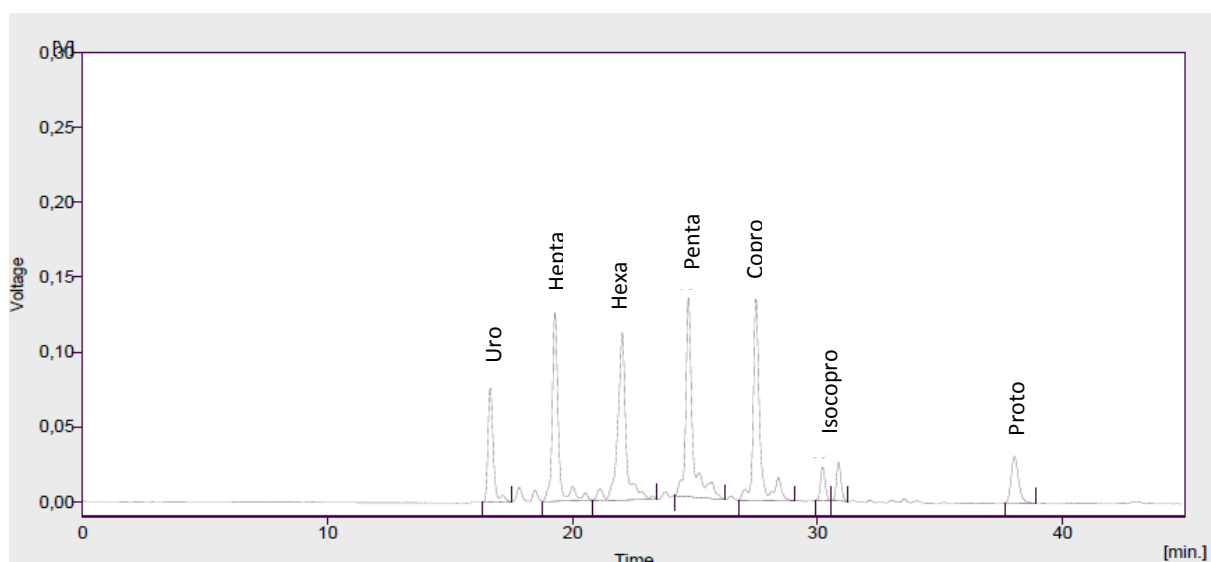


Figura 11. Perfil de elución de porfirinas en RP-HPLC.

XIII. Cuantificación de ALA acumulado intracelularmente

Se incubaron 10 ml de un cultivo planctónico de $\sim 1 \times 10^9$ UFC/ml con ALA, en oscuridad, durante un tiempo definido para cada cepa bacteriana, *S. aureus* ATCC25923, *S. epidermidis*, *E. coli* y *P. aereginosa* ATCC 27853. Se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min y las bacterias sedimentadas se lavaron con PBS, y los sobrenadantes

de la incubación y de los lavados fueron conservados para su posterior cuantificación. Luego, se añadió nitrógeno líquido al pellet de bacterias, con el fin de romper su estructura y obtener el ALA internalizado. Al evaporarse el nitrógeno, se resuspendieron los detritos bacterianos en buffer ácido acético-acetato de sodio 1M pH 4,6, se centrifugó 10 min a 5.000 rpm y se cuantificó el sobrenadante como el ALA internalizado.

Las determinaciones de ALA se realizaron según el método de Mauzerall y Granick (1956). Se agregaron 25 µl de acetil acetona a la muestra conteniendo ALA, la cual se condensó a 100° C durante 10 min. Seguidamente, se pusieron las muestras en hielo y se agregaron 500 µl del reactivo de Ehrlich (2% p-aminobenzaldhído en HCl: ácido acético 1:5) y luego de 8 min se midió la absorbancia a 556 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard con arreglo de diodos modelo 8452A.

XIV. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Biopelículas de *S. aureus* RN6390 se cultivaron en cubreobjetos y las biopelículas de *E. faecalis* sobre placas de titanio como se ha descripto anteriormente. Siguiendo los tratamientos apropiados, las muestras se fijaron para microscopía electrónica de barrido (MEB) con 3% de glutaraldehído en buffer Cacodilato 0,1 M, pH 7,2, durante 2 h a 4°C. Luego de un lavado adicional, las muestras se incubaron con concentraciones crecientes de etanol (25, 50, 75 y 96%) durante 10 min y se secaron a temperatura ambiente.

Por último, los preparados se recubrieron con Au-Pd (40-60%) en un recubridor de Sputter Thermo VG Scientific SC 7620 y se observaron en un MEB (Philips modelo XL30 TMP, Eindhoven, Países Bajos). Los preparados correspondientes a las biopelículas crecidas sobre las placas de titanio, o las placas de titanio solas, fueron realizadas con un microscopio electrónico de barrido (Philips modelo XL30 TMP)

perteneciente al Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia (MACN-CONICET).

XV. Microscopía Confocal de fluorescencia

XV. 1 Determinación de viabilidad en biopelículas bacterianas

Para evaluar el efecto de los diversos tratamientos sobre la viabilidad bacteriana, se llevó a cabo un análisis microscópico empleando el kit BacLight Live/Dead (Molecular Probes, Eugene, OR). El kit incluye dos marcadores fluorescentes de ácido nucleico: SYTO9 (indica viabilidad celular, fluorescencia en verde) e yoduro de propidio (indica ausencia de viabilidad celular, fluoresce en rojo).

Se añadió 1 µl de la solución madre de SYTO9 y otro de yoduro de propidio a 3 ml de PBS y, luego de homogeneizar, se dispensaron 500 µl de la solución en microplacas de 24 pocillos que contenían las biopelículas bacterianas de *S. aureus* RN6390 crecidas sobre cubreobjetos de vidrio, o de *E. faecalis* crecidas sobre las placas de titanio. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min en oscuridad. Las biopelículas marcadas se examinaron mediante microscopía confocal láser de barrido (CSLM) de fluorescencia empleando un microscopio Zeiss LSM 510 Meta Confocal. Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas para detectar SYTO9 fueron 488 y 525 nm; el yoduro de propidio fue excitado a 520 nm y su emisión fue monitorizada a 620 nm.

Se realizaron secciones ópticas de 0,56 µm para cada muestra y se adquirieron imágenes de tres campos aleatorios. Las imágenes se procesaron utilizando el software Image J. Image J también se empleó para obtener valores cuantitativos midiendo Intensidad de fluorescencia para cada canal. En resumen, se obtuvo un valor de fluorescencia para cada sección óptica de la imagen analizada, y luego se sumaron los valores de las diferentes secciones para obtener un valor único para cada imagen. Así,

considerando que no hay co-localización significativa de ambas señales, se utilizó la intensidad relativa en cada canal como indicador de la viabilidad de la biopelícula en una condición dada.

XV.2 Análisis de porfirinas y componentes de las biopelículas bacterianas

Se generaron biopelículas de 24 h de crecimiento de *S. epidermidis*, *S. aureus* ATCC 25823 y *E.coli* sobre cubreobjetos de vidrio estériles y se realizaron los tratamientos correspondientes.. Estas biopelículas fueron marcadas con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 0,01% por 15 min (se une ubicuamente a proteínas y fluorescen en verde) o Concanavalina-FITC 100 ug/ml (marca residuos D-manosil y D-glucosil y fluoresce en verde) y con Hoestch 50 µg/ml durante 15 min (fluorescencia azul en ADN). Por otra parte, la incubación con ALA promueve la síntesis de porfirinas, moléculas cuya fluorescencia es roja.

Luego de las tinciones con los fluorocromos respectivos, luego de ser lavados con PBS, los cubreobjetos fueron invertidos en un papel de filtro impregnado en formaldehido comercial (37%) en una cámara cerrada por 30 seg según modificación de la técnica descripta por Stockert et al. (2012).

Las muestras se montaron en DABCO y fueron observadas en un microscopio confocal de fluorescencia. Se realizaron secciones ópticas de 0,56 µm para cada muestra y se adquirieron imágenes de tres campos aleatorios. Las imágenes se procesaron utilizando el software Image J para obtener la superposición de las imágenes tomadas en los distintos canales.

XVI. Microscopía de epifluorescencia

En los casos en que se quiso observar la tridimensionalidad de la biopelícula y en los que se obtuvieron mejores señales de los fluorocromos que en CLMS, se observaron las muestras fijadas de la manera descrita en XV.2 por microscopía de epifluorescencia. Para ello se empleó un microscopio de fluorescencia Olympus BX51, equipado con una lámpara de Mercurio HBO 100 W y los correspondientes filtros: azul (450-490 nm, filtro de excitación BP 490) para la observación de fluorescencia verde del FITC; verde (545 nm, filtro de excitación BP 545) para la observación de la fluorescencia roja de las porfirinas, y UV (420 nm, filtro de excitación BP 360-370) para la observación de Hoechst. Las fotografías se tomaron con una cámara Olympus Q-color 5.

XVII. Análisis estadístico

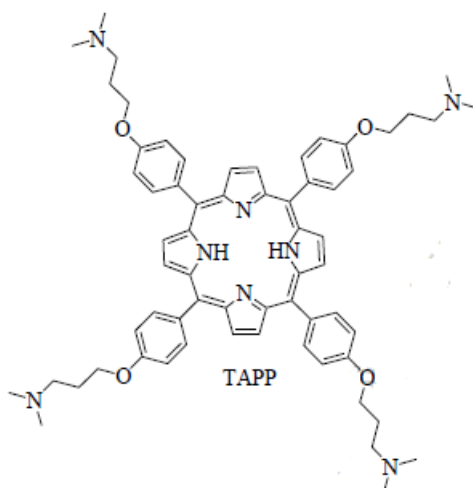
Los valores se representaron como la media \pm error estándar de la media de tres experimentos independientes. Cada condición experimental se realizó por duplicado. Se realizaron pruebas estadísticas utilizando el software GraphPad (versión 5.0, GraphPadPrism). Las diferencias entre dos medias fueron evaluadas por el test *t* de Student. En el caso de no cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad se empleó el test no paramétrico de Mann Whitney. Se consideraron como significativas las diferencias con un valor de $p < 0,05$.

Para determinar la existencia o ausencia de sinergismo producto de la combinación del láser (terapia fototérmica) con la FIB, se realizó un ANOVA de dos factores y la significancia estadística entre tratamientos se evaluó mediante contrastes por el método de Bonferroni. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos para la interacción entre factores (no aditividad).

Resultados

I

Inactivación fotodinámica de cultivos planctónicos y biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* empleando una porfirina sintética



I.1 FIB empleando TAPP en cultivos planctónicos de *S. aureus*

Los cultivos planctónicos de la cepa *S.aureus* RN6390 en presencia de concentraciones crecientes de TAPP, se iluminaron con una dosis de luz fija de 180 J/cm² (Figura I.1). Tras la iluminación, las UFC disminuyeron en función de la concentración de TAPP. Utilizando una concentración baja de TAPP igual a 0,1 µM, se obtuvo un ligero pero significativo efecto fototóxico con respecto a los controles no irradiados tratados con TAPP ($6,8 \times 10^7$ CFU/ml vs $4,2 \times 10^8$ CFU/ml, $p < 0,05$). Al utilizar TAPP 1 µM, se logró una reducción aún mayor, 5 órdenes de magnitud menos en las CFUs de los cultivos incubados con TAPP con respecto al control sin tratar. Cuando la concentración de TAPP aumentó a 2,5 µM, se observó una erradicación total de bacterias.

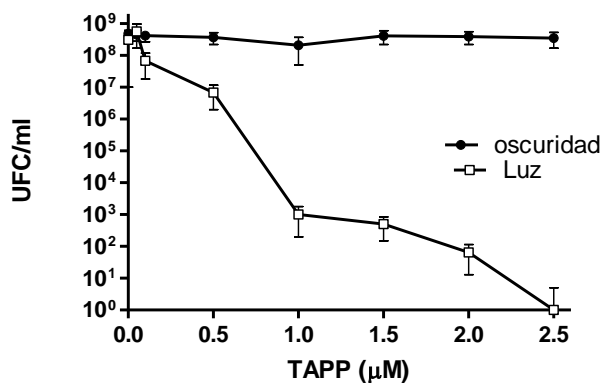


Figura I.1: TAPP-FIB de cultivos planctónicos de *S. aureus* en función de la concentración. Cultivos planctónicos de *S. aureus* se incubaron durante 10 min con diferentes concentraciones de TAPP luego fueron irradiados con 180 J/cm². La viabilidad de los cultivos tratados se estableció mediante plaqueo en TSA seguido de recuento de colonias. Oscuridad: bacterias expuestas a diferentes concentraciones de TAPP. Los resultados representan las medias \pm desvío estándar de tres ensayos independientes realizados por duplicado.

Al incubar *S. aureus* con TAPP 2,5 µM y evaluar el efecto de la administración de dosis de irradiación crecientes, se observó una disminución en la viabilidad bacteriana (Figura I.2). La dosis de luz menor (22,5 J/cm²) indujo una reducción de 1,5

órdenes de magnitud ($4,5 \times 10^6$ UFC/ml luego de TAPP-FIB vs $3,0 \times 10^8$ UFC/ml del control tratado con luz).

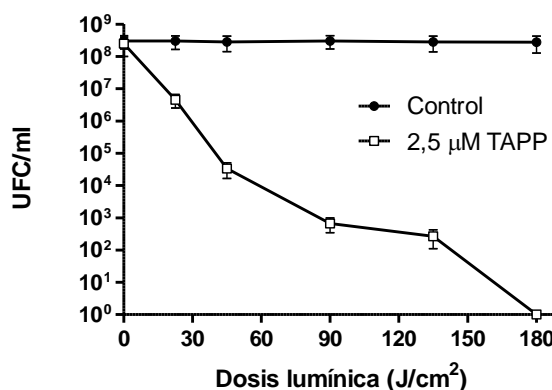


Figura I.2: TAPP-FIB de cultivos planctónicos de *S. aureus* en función de la dosis de luz. Después de 10 min de incubación en oscuridad con TAPP 2,5 µM, los cultivos de *S. aureus* se irradiaron empleando diferentes dosis de luz. La viabilidad de los cultivos tratados, expresada como UFC/ml, se estableció mediante plaqueo en TSA seguido de recuento de colonias. Control: bacterias expuestas a diferentes dosis de luz. Los resultados representan las medias \pm desvío estándar de tres ensayos independientes realizados por duplicado.

A la dosis de luz mayor (180 J/cm^2), se obtuvo una reducción de 8 órdenes de magnitud en la viabilidad bacteriana, es decir, se logró la erradicación completa de las bacterias. Es importante señalar que de lo ya observado en la Figura I.1, las bacterias expuestas a la máxima dosis de luz sin TAPP no mostraron ninguna diferencia notable en los recuentos de colonias en comparación con el control.

I.2 FIB empleando TAPP en biopelículas de *S. aureus*

Para el tratamiento de biopelículas de *S. aureus* RN6390 con TAPP-FIB, fueron necesarias dosis de luz mayores, así como concentraciones más elevadas de TAPP (Figura I.3). TAPP mostró un efecto tóxico en oscuridad a partir de 30 µM. A su vez, la FIB mediada por TAPP comienza a ser efectiva a concentraciones mayores a 15 µM ($1,5 \times 10^6$ CFU/ml de TAPP-FIB frente a $1,9 \times 10^8$ UFC/ml de TAPP sola, $p < 0,05$), induciendo

una reducción de alrededor de dos órdenes de magnitud. Empleando TAPP 20 μM , se obtuvieron alrededor de tres órdenes de reducción ($2,8 \times 10^5$ UFC/ml para TAPP-FIB frente a $1,3 \times 10^8$ UFC/ml sólo con TAPP, $p < 0,05$). A concentraciones mayores de TAPP no se observó un aumento significativo de la respuesta a la FIB, excepto a 50 μM . A esta concentración de TAPP en oscuridad se observa una reducción de 1,5 de órdenes de magnitud, mientras que al realizarse el tratamiento de FIB, se induce una reducción adicional de tres órdenes de magnitud.

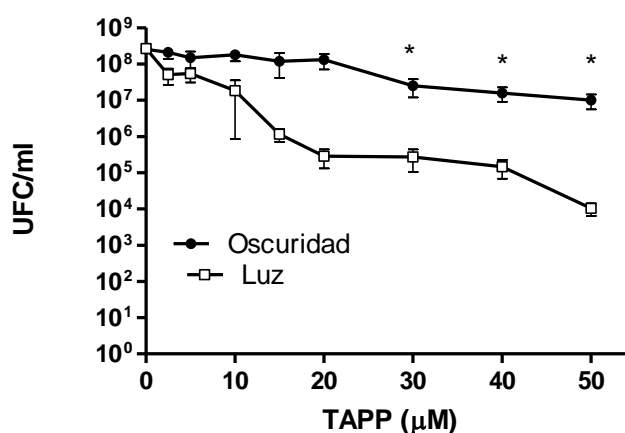


Figura I.3: Inactivación de la biopelícula de *S. aureus* en función de la concentración de TAPP. Las biopelículas de *S. aureus* se incubaron con diferentes concentraciones de TAPP durante 10 min, luego se irradiaron con 180 J/cm^2 . La viabilidad de las suspensiones derivadas de las biopelículas tratadas, expresadas como UFC/ml, se estableció por recuento de colonias. * $p < 0,05$ con respecto a las biopelículas no tratadas con TAPP. Oscuridad: bacterias expuestas a diferentes concentraciones de TAPP. Los resultados representan las medias \pm desvío estándar de cuatro ensayos independientes realizados por duplicado.

Al observar la respuesta a la FIB empleando TAPP 20 μM en función de la dosis de luz (Figura I.4), se obtuvo inactivación de bacterias en biopelículas incluso a la dosis de luz menor, es así que al irradiar con $22,5 \text{ J/cm}^2$ se obtuvieron $6,8 \times 10^7$ UFC/ml vs $3,4 \times 10^8$ UFC/ml del control en oscuridad, $p < 0,05$.

Por otra parte, se observó una disminución en las UFC al aumentar la dosis de luz, no obstante, la pendiente de la disminución de UFC fue menor que la obtenida para las mismas bacterias en crecimiento planctónico.

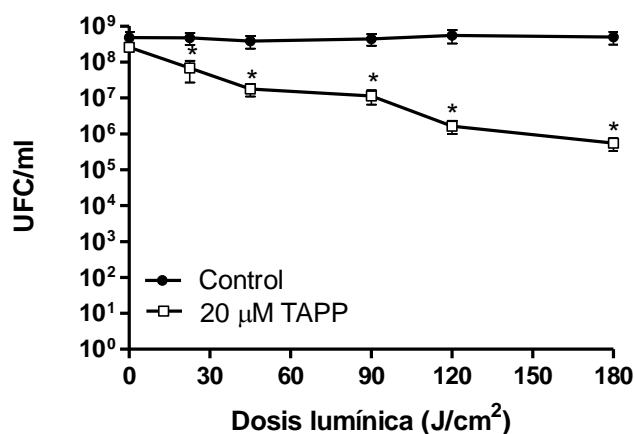


Figura I.4: TAPP-FIB de biopelículas de *S. aureus* en función de la dosis de luz. Después de 10 min de incubación a oscuridad con TAPP 20 µM, se irradiaron cultivos de *S. aureus* empleando diferentes dosis de luz. La viabilidad de las suspensiones derivadas de las biopelículas tratadas, expresadas como UFC/ml, se estableció por recuento de colonias. Control: bacterias expuestas a diferentes dosis de luz. * P < 0,05 con respecto a las biopelículas no tratados con TAPP. Los resultados representan las medias ± desvío estándar de cuatro ensayos independientes realizados por duplicado.

I.3 Captación/unión de TAPP a *S. aureus* creciendo en estado planctónico y en biopelículas

La Figura I.5 representa la unión/incorporación de TAPP tanto en bacterias planctónicas como en biopelículas. Mientras que la unión/incorporación de TAPP por bacterias en cultivo planctónico no aumenta con el tiempo de incubación, en el caso de biopelículas se observa un ligero aumento. En ambas formas de crecimiento de las bacterias, la cantidad de TAPP unida/incorporada a la bacteria aumenta en función de la concentración de TAPP, aunque este comportamiento es más marcado en las bacterias en crecimiento planctónico. En términos de captación de porfirinas, las

suspensiones de bacterias unen y/o incorporan tres órdenes de magnitud más TAPP que las bacterias que crecen en biopelículas en condiciones iguales de TAPP.

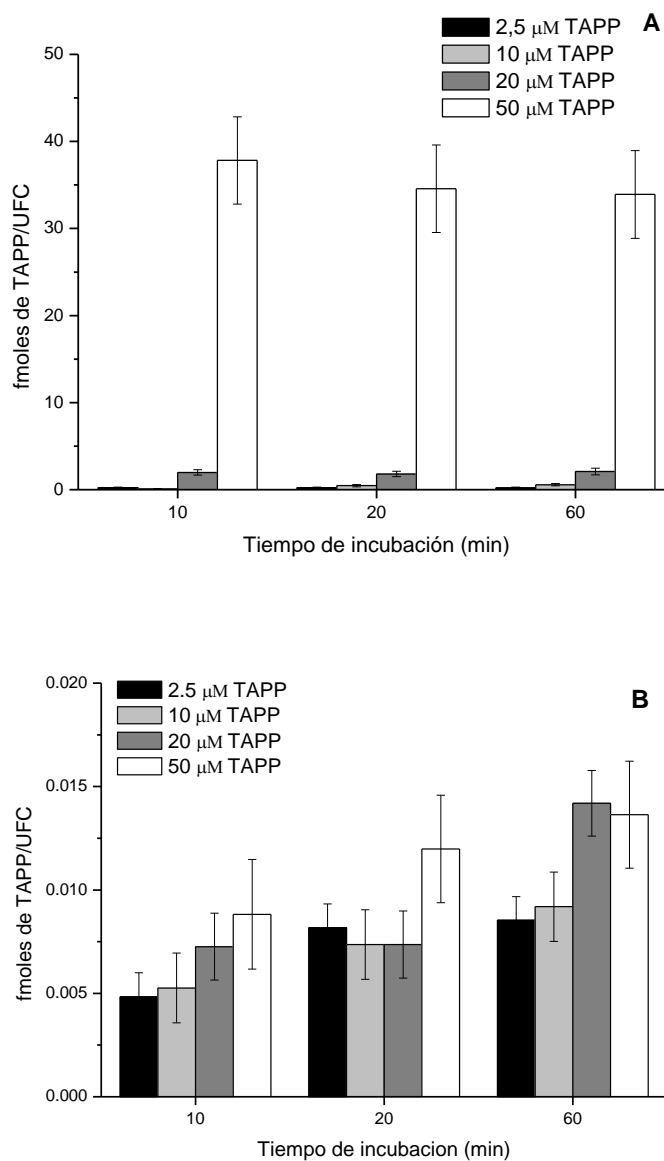


Figura I.5: Unión y/o pegado de TAPP a bacterias de *S. aureus*. Se incubaron cultivos planctónicos (A) o biopelículas(B) de *S. aureus* en presencia de diferentes concentraciones de TAPP durante diferentes períodos de tiempo. La cantidad de TAPP unida y/o incorporada a las bacterias se cuantificó por fluorescencia y se normalizó al número de UFC. Los resultados representan las medias \pm desvío estándar de dos ensayos independientes realizados por duplicado.

I.4 TAPP-FIB de *P. aeruginosa* creciendo en estado planctónico y en biopelículas

Con el fin de determinar la eficacia de TAPP-FIB en bacterias Gram-negativas, se realizó este tratamiento tanto en cultivo planctónico como en biopelículas, empleando un aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa*.

En primer lugar, los cultivos planctónicos se sometieron a incubaciones con distintas concentraciones de TAPP y se irradiaron con una dosis de luz de 180 J/cm^2 (Figura I.6). Para lograr fotosensibilización en dichas bacterias, fueron necesarias concentraciones de TAPP que indujeron toxicidad en oscuridad. Empleando TAPP $10 \mu\text{M}$ se obtuvo un grado significativo de fotoinactivación (1,5 órdenes de reducción en las UFC con respecto al control de TAPP sin irradiar). A partir de TAPP $20 \mu\text{M}$ el grado de reducción de UFC fue alrededor de 3 órdenes de magnitud en comparación con el control de TAPP sin luz.

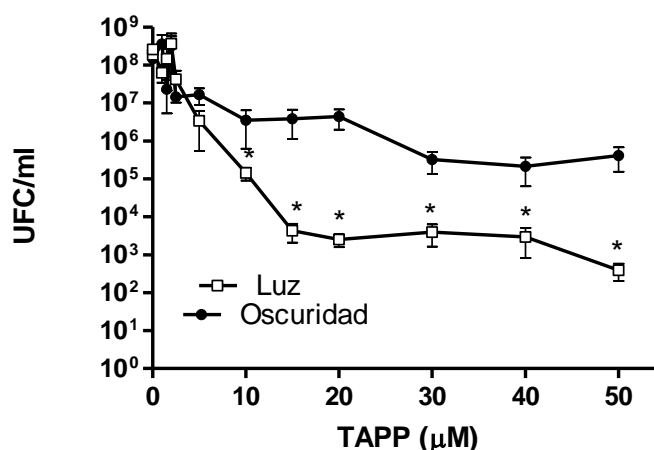


Figura I.6: Inactivación fotodinámica de cultivos planctónicos de *P. aeruginosa* en función de la concentración de TAPP. Se trataron los cultivos planctónicos de *P. aeruginosa* con diferentes concentraciones de TAPP durante 10 minutos y luego se irradiaron con 180 J/cm^2 . La viabilidad de los cultivos tratados se estableció por plaqueo sobre TSA seguido de recuento de colonias. Oscuridad: bacterias expuestas a diferentes concentraciones de TAPP. * $p < 0,05$ con respecto a los biopelículas tratadas con TAPP en oscuridad. Los resultados representan las medias \pm desvío estándar de tres ensayos independientes realizados por duplicado.

Por otro lado, las altas concentraciones de TAPP no fueron tóxicas para *P. aeruginosa* creciendo en biopelículas, y se obtuvieron reducciones significativas de las UFC al fotoinactivar empleando TAPP 30 μM , observando una reducción de 3 órdenes de magnitud de UFC/ml al comparar con cultivos incubados TAPP sin irradiar (Figura I.7).

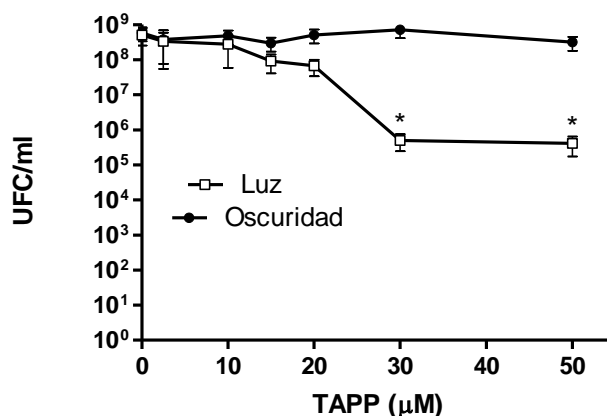


Figura I.7: Inactivación de biopelículas de *P. aeruginosa* en función de la concentración de TAPP. Las biopelículas de *P. aeruginosa* se incubaron con diferentes concentraciones de TAPP durante 10 minutos, luego se irradiaron con 180 J/cm^2 . La viabilidad de las suspensiones derivadas de biopelículas tratadas, expresadas como UFC/ml, se estableció por recuento de colonias. * $p < 0,05$ con respecto a las biopelículas tratadas con TAPP en oscuridad. Oscuridad: bacterias expuestas a diferentes concentraciones de TAPP. Los resultados representan las medias \pm desvío estándar de cuatro ensayos independientes realizados por duplicado.

I.5 Microscopía de biopelículas de *S. aureus* tratados con TAPP-FIB

El efecto del tratamiento TAPP-FIB en biopelículas de *S. aureus* también se observó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Estas imágenes (Figura I.8) revelan que después del tratamiento, muchas bacterias se levantan de la superficie, mostrando cúmulos bacterianos menos densos, sin cambios apreciables en la apariencia de las bacterias. Sin embargo, la viabilidad en estos cúmulos remanentes

también se redujo, como lo demuestra la microscopía confocal de fluorescencia (CLSM) luego de exposición al kit Live/dead. Mientras que las biopelículas de *S. aureus* tratadas sólo con TAPP mostraron bacterias vivas (fluorescencia verde), las biopelículas tratadas con TAPP-FIB mostraron células fluorescentes verdes (vivas) y rojas (muertas). La cuantificación de las señales verdes y rojas sugiere que la mayoría de las células muertas debido a la TAPP-FIB, se ha desprendido de la superficie y que la proporción de células vivas ha disminuido del 80 al 54%. Por tanto, tanto la reducción de la densidad bacteriana como el deterioro de la viabilidad de las células remanentes, representan la disminución en el conteo de colonias luego de la TAPP-FIB observada en las Figuras I.3 y I.4.

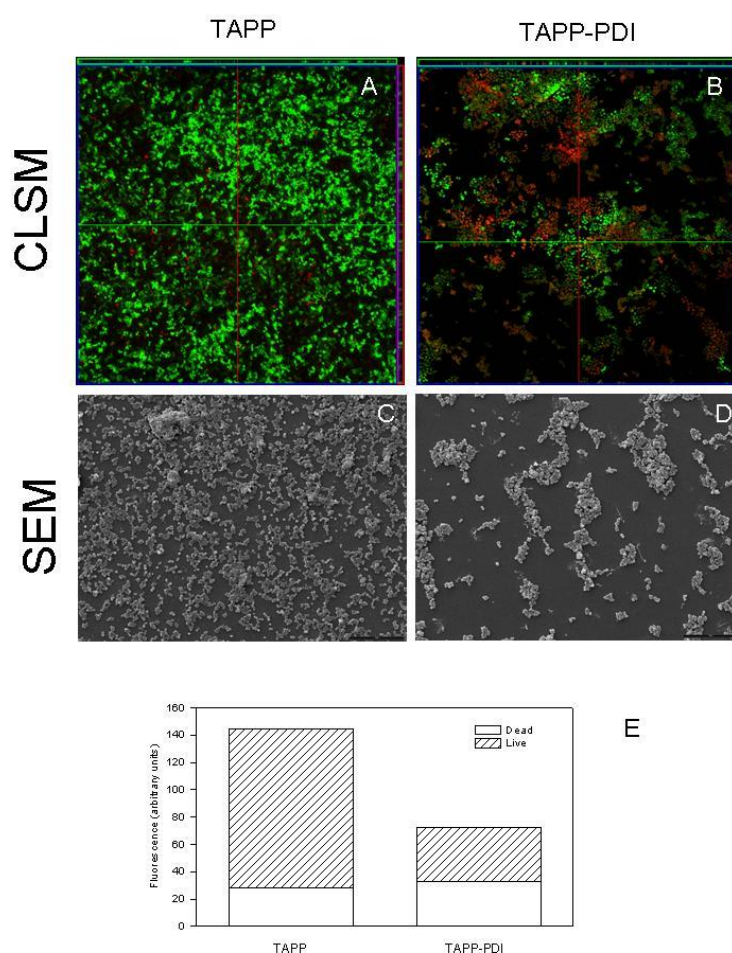


Figura I.8: Análisis de imágenes de MEB y CLSM de biopelículas de *S. aureus* tratados con TAPP-FIB. Biopelículas tratadas con TAPP 20 μ M y no irradiadas (A, C) o TAPP (20 μ M) tratadas e irradiadas a 180

J/cm² (B, D). Después del tratamiento, las biopelículas se tiñeron con el kit BacLight Live/Dead antes del análisis por CLSM (A, B) o se fijaron y observaron en MEB (C, D). Cuantificación de las señales de fluorescencia roja y verde de las imágenes A y B (E).

I.6 Discusión

Entre otras características, se ha propuesto que el carácter catiónico de los fotosensibilizantes influye en el resultado de la FIB. Se ha informado que los derivados catiónicos de porfirinas son capaces de inducir fotoinactivación de bacterias Gram positivas y negativas y algunos estudios han comparado la eficiencia de las porfirinas catiónicas meso-sustituidas sintéticas con diferente distribución de carga (tetra-, Tri-, di- o monocatiónico). Algunos de ellos han demostrado que las porfirinas tetracatónicas son eficientes FS contra las bacterias Gram positivas y negativas. Sin embargo, también se ha informado que las porfirinas di- y tri-catiónicas son FS más eficientes que las tetracatónicas contra ambos tipos de bacterias (Alves et al., 2010; Merchat et al., 1996; Lazzetti et al., 2004).

Las porfirinas que contienen sustituyentes catiónicos intrínsecos o precursores de los mismos, han atraído considerable interés debido a su notable capacidad como agentes fototerapéuticos (Alves et al., 2015). En particular, TAPP es altamente eficiente en la producción de oxígeno singlete con un rendimiento cuántico de alrededor de 0,5 en DMF (Mora et al., 2013). Estas propiedades fotodinámicas junto con una alta afinidad por las bacterias, hacen de esta porfirina un prometedor y eficaz agente FS.

La molécula de TAPP consiste en una porfirina sustituida por cuatro grupos amino alifáticos en la periferia del macrociclo, que pueden adquirir cargas positivas a pH fisiológico. El sustituyente de TAPP, una N, N-dimetil-n-propilamina, presenta un pKa ~ 10 en agua. Debido a que aproximadamente el 99,8% de los grupos aminos se encuentran protonados a un pH fisiológico de 7,2, el grupo amino de TAPP se encontraría protonado (Mora et al., 2013). Además, los grupos amino de TAPP están separados del anillo porfirínico por medio de una cadena alifática, teniendo por lo

tanto una influencia mínima sobre las propiedades fotofísicas de la porfirina (Caminos y Durantini, 2005). Al mismo tiempo, el espaciador de propoxi permite una alta movilidad de las cargas y promoviendo de esta forma la unión a las células microbianas.

El cultivo planctónico de *S. aureus* incubado con TAPP 1 μM e irradiado con una dosis lumínica de 180 J/cm^2 sufrió una reducción de ~ 5 logs de UFC/ml, obteniéndose resultados comparables de fotoinactivación utilizando TAPP 2,5 μM y una dosis lumínica de 90 J/cm^2 . De manera similar, pero en una menor fotosensibilización bacteriana, TAPP 15 μM y una dosis lumínica de 180 J/cm^2 indujeron una reducción de 2-logs de UFC/ml al crecer las bacterias formando biopelículas. El mismo grado de muerte celular se obtuvo aplicando TAPP 20 μM y una dosis lumínica de 120 J/cm^2 , sugiriendo que se podrían emplear concentraciones más bajas de TAPP y dosis de luz mayores con el fin de lograr niveles iguales de fotosensibilización.

Algunos resultados ya reportados sobre la eficiencia de otros FS catiónicos en el tratamiento de fotoinactivación de bacterias en crecimiento planctónico son difíciles de comparar con los obtenidos en este trabajo debido principalmente a diferentes densidades bacterianas y a los sistemas de irradiación empleados. Por ejemplo, es sabido que las porfirinas catiónicas 5,10,15,20-tetrakis (4-N, N, N-trimetilamoniofenil)porfirina (TMAP⁴⁺) y TMPyP⁴⁺ actúan como FS en la erradicación de microorganismos (Reddi et al., 2002; Pereira et al., 2014), pero las dosis de luz no son comparables con las utilizadas en este trabajo. Sin embargo, empleando dosis de luz similares a las utilizadas en esta investigación (133 J/cm^2) y 4 μM de Porfirina, TMPyP⁴⁺ indujo una reducción menor a 1 log de UFC/ml, mientras que TMAP⁴⁺ produjo una disminución de 3 log en la supervivencia de células de *S. aureus* (Banfi et al., 2006). Además, la fotoinactivación mediada por 5,10,15,20-tetrakis [3- (N-etil-N-metilcarbazolil)] porfirina (TCP4⁺) mostró una reducción menor a 1 log de UFC/ml cuando las células fueron tratadas con 1 μM del FS (Ballatore et al., 2014). Por otro lado, un grado de fotosensibilización similar al obtenido en esta Tesis, se obtuvo utilizando 5,10,15,20-Tetrakis (1-metilpiridinio-4-il) porfirina (Tetra-Py + -Me) y otras

porfirinas contra las bacterias Gram-positivas, *Enterococcus faecalis* y *S. aureus* (una reducción de ~ 7-log de UFC/ml empleando 5 μ M y una dosis de luz baja) (Pereira et al., 2014; Alves et al., 2010).

Para lograr la fotoinactivación de biopelículas, fueron necesarias concentraciones de TAPP y dosis lumínicas mayores en comparación con las utilizadas en cultivos planctónicos. Mientras que TAPP 2,5 μ M fue suficiente para inducir la erradicación total de bacterias planctónicas (reducción de 8 logs de UFC/ml), para inducir una reducción de 3 log de UFC/ml en bacterias que crecen en biopelículas fue necesaria una concentración 10 veces mayor. Ambos obstáculos, la penetración de la luz dentro de las biopelículas (Lin et al., 2004) y la incapacidad del FS para difundir a las regiones internas de la estructura (Gad et al., 2004; Zanin et al., 2006) podrían ser las causas de los niveles menores de fotoinactivación. Además, la diversidad genética dentro de la biopelícula y la comunicación de bacterias a través de la detección de quórum contribuyen a una mayor resistencia de las biopelículas al tratamiento por FIB (Maisch, 2015).

Se ha obtenido una reducción de 3 log de UFC/ml en biopelículas de *S. aureus* empleando TAPP 20 μ M y una dosis lumínica de 180 J/cm². Las concentraciones más altas de TAPP indujeron una reducción ligeramente mayor de la viabilidad de las bacterias a expensas de efectos tóxicos en oscuridad. La presencia de células muertas en toda la biopelícula, revelado por el análisis por CLSM, implica que no hubo ningún obstáculo para que los FS difundan dentro de la estructura. Además, en la FIB empleando TAPP se observó una separación de partes de la biopelícula que condujo a una perturbación en su arquitectura, como ha sido reportado anteriormente para la acción fotodinámica de otros FS (Di Poto et al., 2009).

Con respecto a la eficacia del tratamiento en la fotosensibilización de biopelículas bacterianas, se conocen resultados variables. Se han llevado a cabo muy pocos estudios empleando porfirinas como FS en FIB de *S. aureus*, y los resultados obtenidos han sido diferentes. Di Poto et al (2009) han tratado biopelículas de tres

cepas distintas de *S. aureus* con TMPyP 10 μM e irradiando con luz blanca ($200\text{mW}/\text{cm}^2$), obteniendo una tasa de muerte bacteriana de 1 a 2 log de UFC/ml en la dosis de luz más elevada dependiendo de la cepa. Además, la misma porfirina catiónica tetra-sustituida indujo una reducción significativa en la supervivencia bacteriana de *S. epidermidis* después de la irradiación (Sbarra et al., 2009). Por otro lado, la FIB empleando la porfirina tetracatónica Tetra-Py + -Me (5,10,15,20-tetrakis (1-metilpiridinio-4-il) porfirinatetraioduro) indujo reducciones máximas de 6,3 logs de UFC/ml en biopelículas de *S. aureus*, empleando una concentración igual a 20 μM de la porfirina y aplicando una dosis de luz de baja energía de $4\text{ mW}/\text{cm}^2$ durante un tiempo prolongado de 270 min ($64,8\text{ J}/\text{cm}^2$) (Beirão et al., 2013). No sólo la energía total suministrada, sino también la fluencia, tienen un impacto en el resultado del tratamiento.

La muerte bacteriana a través de este tratamiento es definitivamente más fácil de lograr en bacterias Gram-positivas que en Gram negativas. Mientras que las bacterias Gram-positivas presentan una pared celular gruesa y porosa de peptidoglicanos que rodean una membrana citoplasmática, las bacterias Gram-negativas tienen una membrana externa, una pared celular de peptidoglicano más delgada y una membrana citoplasmática que contiene endotoxinas, bloqueando antibióticos, colorantes y detergentes, protegiendo tanto la membrana interna como la pared celular. Por consiguiente, para realizar la FIB, es necesario que el FS empleado penetre las paredes celulares de las bacterias y se localice en la membrana plasmática o en el citoplasma. Dado la complejidad de la membrana de las bacterias Gram-negativas se ve limitada la difusión simple de los FS en el citosol bacteriano (Sperandio et al., 2013).

Al extender este estudio al tratamiento de una bacteria Gram-negativa como *P. aeruginosa*, fueron requeridas concentraciones de TAPP mayores que para fotoinactivar cultivos planctónicos de la misma, en comparación con *S. aureus*. Mientras que la reducción de 6-logs de UFC/ml de suspensiones planctónicas de *S. aureus* se alcanzó empleando TAPP 1 μM , para *P. aeruginosa* se obtuvo sólo una

reducción de 3 log de UFC/ml empleando TAPP 20 μ M, siendo esta una concentración que induce toxicidad en oscuridad. Por otro lado, para el tratamiento de biopelículas tanto de *S. aureus* como de *P. aeruginosa*, se obtuvieron grados de eficiencia similares en el tratamiento de TAPP-FIB (reducción de 3 logs de UFC/ml). Además, en las biopelículas de *S. aureus* se observó toxicidad en los controles en oscuridad a concentraciones elevadas de TAPP, mientras que la porfirina no era tóxica en las biopelículas de *P. aeruginosa*.

Considerando la respuesta a TAPP-FIB de las cepas Gram-positivas y Gram-negativas empleadas, se plantea la hipótesis de que la complejidad de la arquitectura de la biopelícula supera las diferencias en penetración de TAPP. Esta característica se pone de manifiesto si analizamos la cantidad de TAPP unido/incorporado a las bacterias en biopelículas de *S. aureus*, 3 órdenes de magnitud inferior a la cantidad unida a bacterias crecidas en cultivo planctónico.

Las bacterias que crecen en biopelículas se encuentran embebidas en una matriz que está compuesta principalmente por ADN extracelular, proteínas y polisacáridos. La matriz de la biopelícula, también denominada EPS (por sus siglas en inglés de “Sustancia polimérica extracelular”), puede retardar la difusión del fármaco debido a su mayor viscosidad o incluso actuar como barrera. Los agentes cargados positivamente pueden unirse a moléculas de EPS cargadas negativamente, y siendo las interacciones π - π de compuestos aromáticos posibles, se evita la penetración del fármaco en las partes más profundas de la biopelícula (Cieplik et al., 2014). Teniendo en cuenta nuestros resultados, las moléculas TAPP pueden cruzar la barrera de EPS de las bacterias Gram positivas y negativas analizadas, aunque su matriz presente una composición diferente.

I.7 Conclusiones

La principal conclusión de este Capítulo es que TAPP es un FS prometedor y eficiente capaz de promover la muerte fotodinámica tanto de bacterias Gram-negativas como de bacterias Gram-positivas en crecimiento planctónico, aunque más eficazmente en el segundo caso. Además, la TAPP-FIB induce tasas de fotoinactivación similares en ambos tipos de bacterias que crecen en biopelículas, con menor toxicidad en los controles en oscuridad de bacterias Gram-negativas.



**Fotoinactivación de biopelículas bacterianas en
superficies de titanio empleando TAPP y
tratamiento fototérmico con láser de 980 nm**

II.1 Caracterización de las placas de titanio

II.1.1 Microscopía electrónica de barrido de las placas de titanio

A fin de determinar la existencia de diferencias cualitativas asociadas a la porosidad del relieve como consecuencia de los diversos tratamientos realizados sobre las superficies de las placas de titanio (véase Materiales y Métodos), se observaron las mismas por microscopía electrónica de barrido. La Figura II.1 muestra las imágenes obtenidas correspondientes a las cuatro placas de titanio bajo estudio.

En todas las superficies analizadas se observaron alteraciones topográficas. Los relieves de las muestras con anodizado y recubrimiento de Ca-P (Figura II.1 A y D) presentaron similitudes de porosidad mientras que la muestra perteneciente al desbaste con lija (Figura II.1 C) se diferenció por expresar estriaciones mayoritariamente longitudinales. En el caso de la placa expuesta al ataque ácido (Figura II.1 B), se destacaron irregularidades con distinta profundidad y de carácter cualitativo disímil al resto de las superficies.

II.1.2 Formación de biopelículas sobre placas de titanio con distintos tratamientos

A fin de analizar la respuesta a la TAPP-FIB de las biopelículas formadas por *E. faecalis* sobre las diversas superficies de titanio obtenidas según: i) anodizado, ii) tratamiento de ataque ácido, iii) lijado, y iv) recubrimiento de Ca-P, se realizaron una serie de experimentos previos a la fotoinactivación. Para ello inicialmente se determinó la formación sobre titanio de biopelículas inmadura (2 h) y madura (24 h) de *E. faecalis* mediante el recuento de las UFC/ml (Figura II.2). Se utilizó una placa de poliestireno como superficie referente de adherencia bacteriana y formación de biopelícula. No se observaron diferencias significativas tanto en la formación como en la adhesión inicial de las biopelículas de *E. faecalis* sobre las cuatro placas de titanio. Asimismo, los valores obtenidos no presentaron diferencias significativas con aquellos

obtenidos sobre la superficie de poliestireno (control). Cabe destacar que se observó un mayor número de UFC/ml a tiempos de 24 h respecto a aquellos obtenidos a las 2 h (Figura II.1).

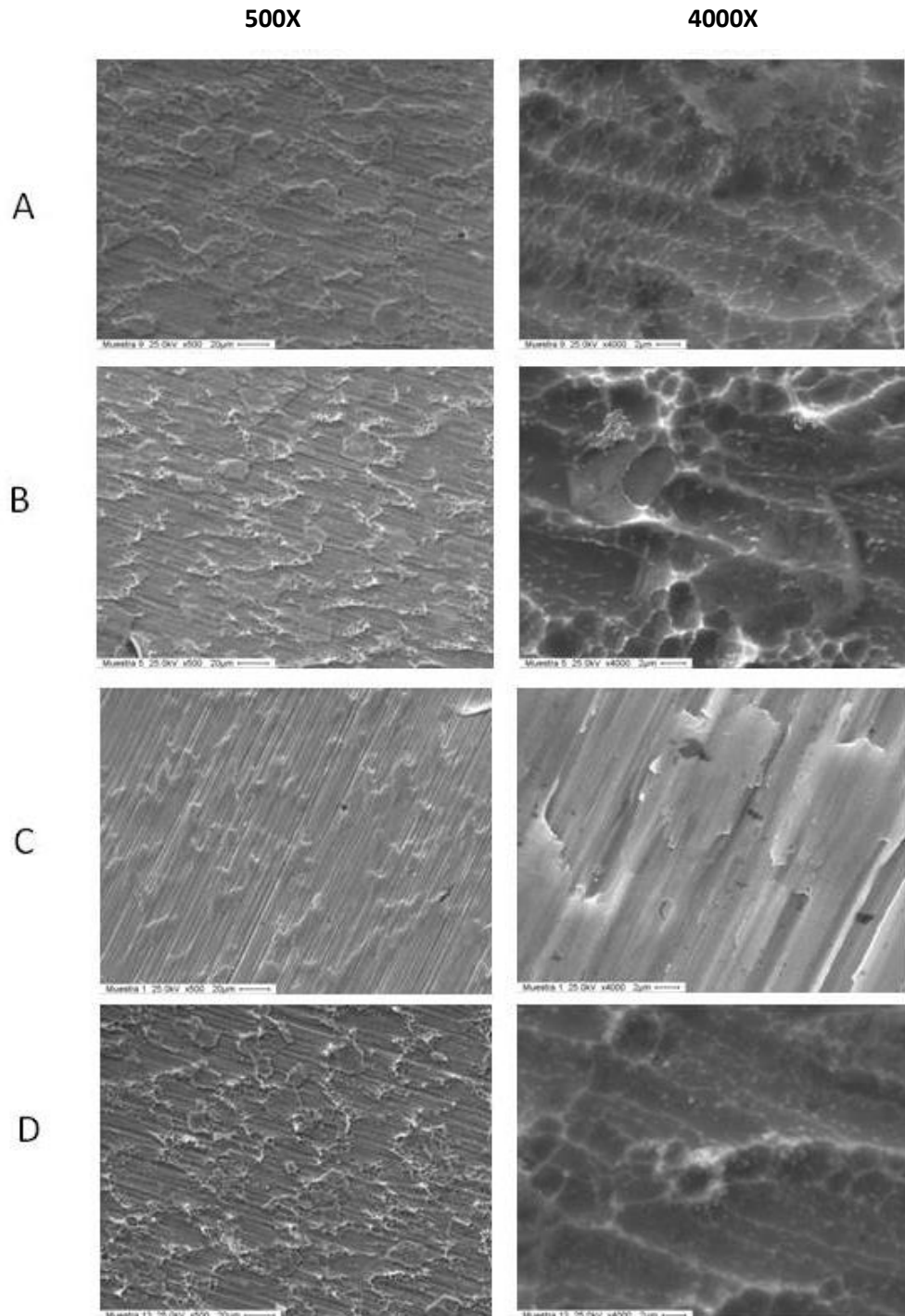


Figura II.1. MEB de las placas de titanio. Microscopía electrónica de barrido de 4 placas de titanio con recubrimientos diferentes. (A) Placa cubierta con anodizado. (B) Superficie de placa alterada mediante ataque ácido. (C) Placa tratada con desbaste con lija; (D) Placa con recubrimiento de Ca-P. Las imágenes se muestran con un aumento de 500X y 4000X.

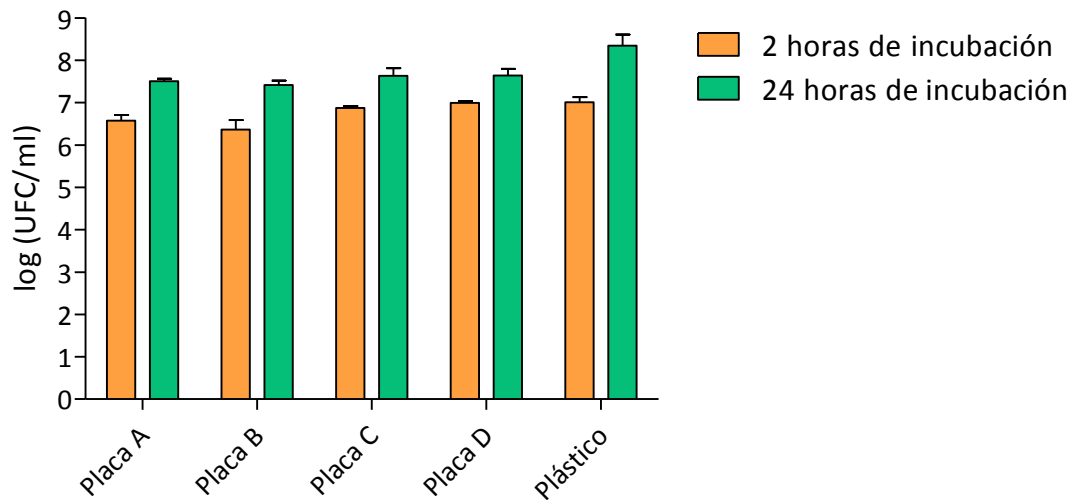


Figura II.2 Biopelículas de *E. faecalis* sobre placas de titanio. La cepa de *E. faecalis* fue incubada durante 2 y 24 h sobre placas de titanio con diferentes superficies: (A) Placa cubierta con anodizado a 10 V en fosfato monoácido 2%. (B) Superficie de placa alterada mediante ataque ácido en solución %5 v/v HNO₃. (C) Placa tratada con desbaste con lija al agua. (D) Placa con recubrimiento de Ca y P. La comparación entre ambos tiempos no resultó significativa ($p > 0,05$). La placa de plástico vs. placas de titanio incubadas durante 24 h tuvo un $p > 0,05$.

Por otro lado, se realizaron estudios de microscopía electrónica de barrido de las biopelículas de *E. faecalis* formadas durante 24 h sobre las distintas placas de titanio (Figura II.3). Las biopelículas formadas en las distintas superficies de titanio mostraron ser similares en cuanto a densidad celular. A pesar del grado de maduración de las biopelículas, aquellas formadas sobre la superficie de poliestireno se observaron con menor estructuración respecto a las crecidas sobre titanio.

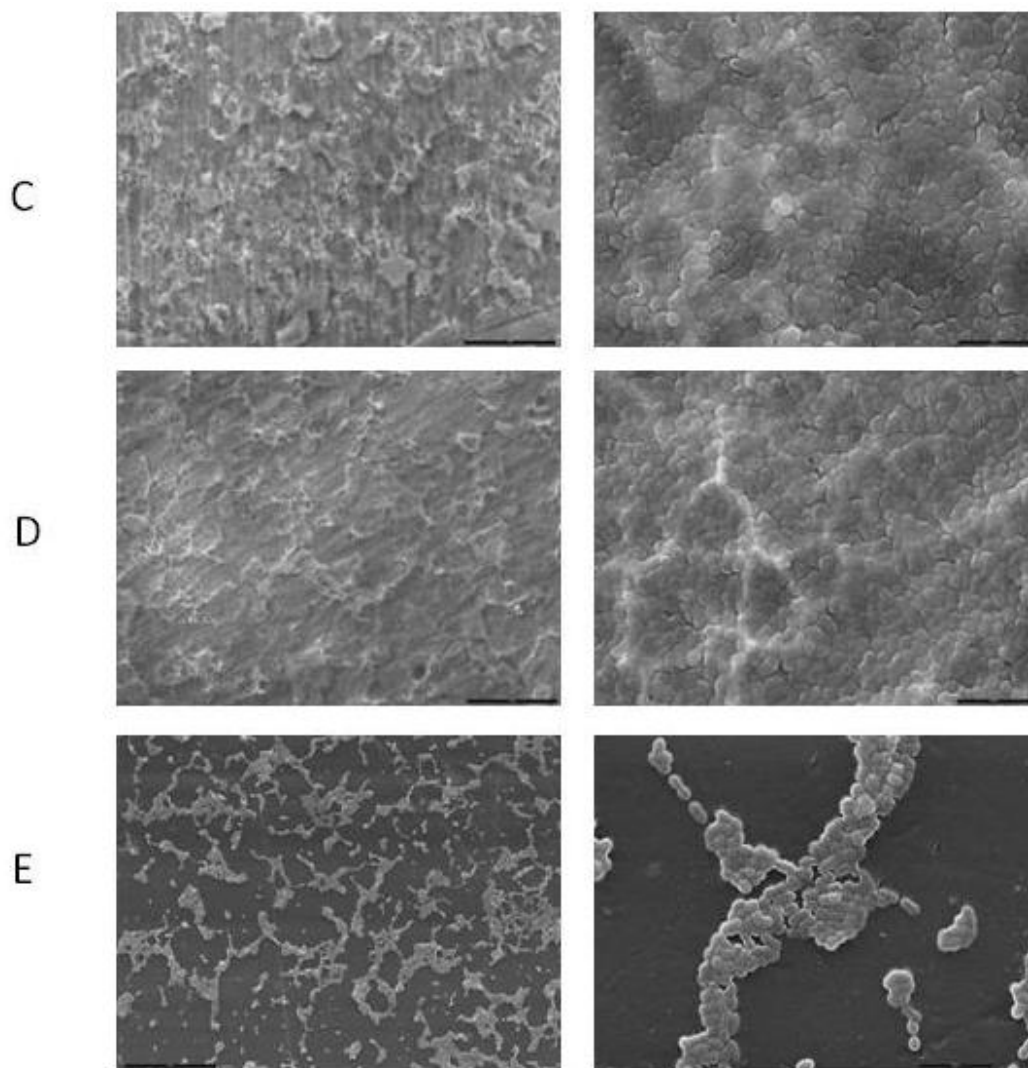


Figura II.3. Microscopía electrónica de barrido de biopelículas de *E. faecalis* sobre placas de titanio y plástico. Microfotografías de MEB de biopelículas crecidas sobre las distintas superficies durante 24 h de incubación: 500X (columna de la izquierda) y 4000X (columna de la derecha). A: placa cubierta por anodizado; B: superficie de placa alterada mediante ataque ácido; C: porosidad de placa lograda mediante desbaste con lija; D: placa con recubrimiento de Ca y P; E: placa de poliestireno de igual tamaño que las de titanio.

II.2 TAPP-FIB en biopelículas de *E. faecalis*

II.2.1 TAPP-FIB en biopelículas de *E. faecalis* crecidas sobre placas de poliestireno

En una primera etapa se llevó a cabo el tratamiento TAPP-FIB se realizó sobre las biopelículas de *E. faecalis* con 24 h de crecimiento sobre placas multiwells de

poliestireno a fin de setear las condiciones óptimas para la fotosensibilización de dicha bacteria crecida sobre titanio. Se evaluaron concentraciones crecientes de TAPP incubando 1 h e irradiando con una dosis lumínica fija de 165 J/cm^2 (Figura II.4).

Los resultados obtenidos mostraron que la cepa utilizada no posee sensibilidad intrínseca a la luz, ya que no se observaron diferencias significativas entre el control irradiado en ausencia de TAPP y el control con TAPP no irradiado. Por otro lado, la disminución en las UFC/ml luego de incubar 1 h en oscuridad con TAPP $5 \mu\text{M}$ resultó significativa en relación al control sin TAPP e irradiado, lo que evidencia que a partir de esta concentración, TAPP resultó tóxico *per se* en oscuridad. Hasta $2,5 \mu\text{M}$ no se observó toxicidad en oscuridad y se obtuvo una reducción de 2 órdenes de magnitud en relación a los controles no irradiados. Es importante mencionar que a partir de TAPP $0,5 \mu\text{M}$ ya fue posible observar una respuesta a la fotoinactivación. En los siguientes experimentos de TAPP-FIB sobre biopelículas de *E. faecalis* formadas sobre las placas de titanio, se utilizó una concentración igual a $2,5 \mu\text{M}$ (durante 1 h y con una dosis lumínica fija de 165 J/cm^2) ya que mostró efecto antimicrobiano significativo y no resultó tóxica para las bacterias en oscuridad.

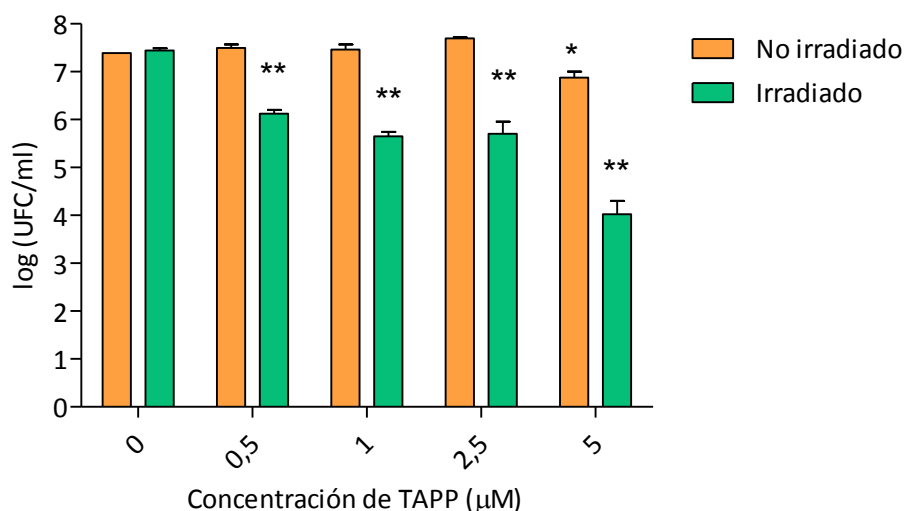


Figura II.4. Efecto de distintas concentraciones de TAPP en la FIB de biopelículas de *E. faecalis* crecidas sobre placas de poliestireno. El tiempo de formación de las biopelículas fue de 24 h , luego del cual se agregó TAPP durante 60 min. La irradiación se realizó con dos lámparas halógenas durante 120 minutos (165 J/cm^2). El control de cada concentración de TAPP irradiada refiere a las biopelículas expuestas a la

misma concentración del fotosensibilizante pero sin ser expuestas a la luz. * $p < 0,05$ respecto al control -TAPP-Luz; ** $p < 0,05$ respecto a su respectivo control + TAPP-Luz.

II.2.2 TAPP-FIB en biopelículas de *E. faecalis* crecidas sobre placas de titanio

Teniendo en cuenta la concentración de TAPP óptima hallada sobre biopelículas sembradas sobre poliestireno, se procedió a realizar las TAPP-FIB sobre las 4 superficies de titanio. La fotoinactivación generada por TAPP produjo una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad bacteriana de 2 órdenes de magnitud al compararla con aquella observada en el control sin TAPP y sin irradiar para todas las placas de titanio (Figura II.5), por lo cual de aquí en adelante se realizaron los experimentos en una sola de las superficies de titanio, que es la debastada con lija (Placa A).

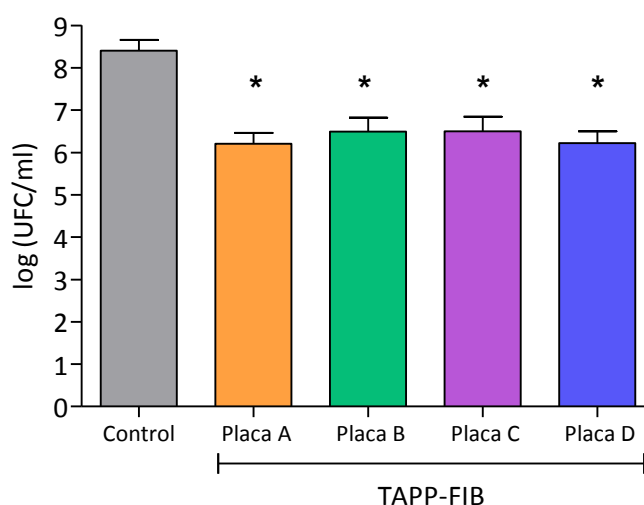


Figura II.5 TAPP-FIB en biopelículas de *E. faecalis* crecidas sobre placas de titanio. Biopelículas de *E. faecalis* de 24 h de formación sobre las placas de titanio con diferentes superficies y sobre plástico: Placa A: Anodizado a 10 V en fosfato monoácido 2%; Placa B: Ataque ácido en solución %5 v/v HNO₃; Placa C: Desbaste con lija al agua; Placa D: Recubrimiento de Ca-P. Se representa el recuento de UFC/ml luego de la FIB con 2,5 μ M de TAPP y 165 J/cm². * $p < 0,05$ de la respuesta a la TAPP-FIB respecto al control tratado con TAPP sin irradiar.

II.3 Caracterización del tratamiento fototérmico

II.3.1 Efecto fototérmico de la irradiación con láser de 980 nm

Para conocer el efecto térmico que produce el tratamiento con un láser de 980 nm, se registraron valores de temperatura sobre agua colocada sobre placas multiwells y agua colocada sobre placas de titanio depositadas sobre pocillos de placas multiwell (véase Materiales y Métodos). Se observó que la irradiación induce un importante aumento de la temperatura del agua sobre placas de titanio, que es creciente en función de la potencia empleada, y a 30 W el valor de la temperatura se duplicó en relación a los valores obtenidos luego de irradiar agua (Figura II.6).

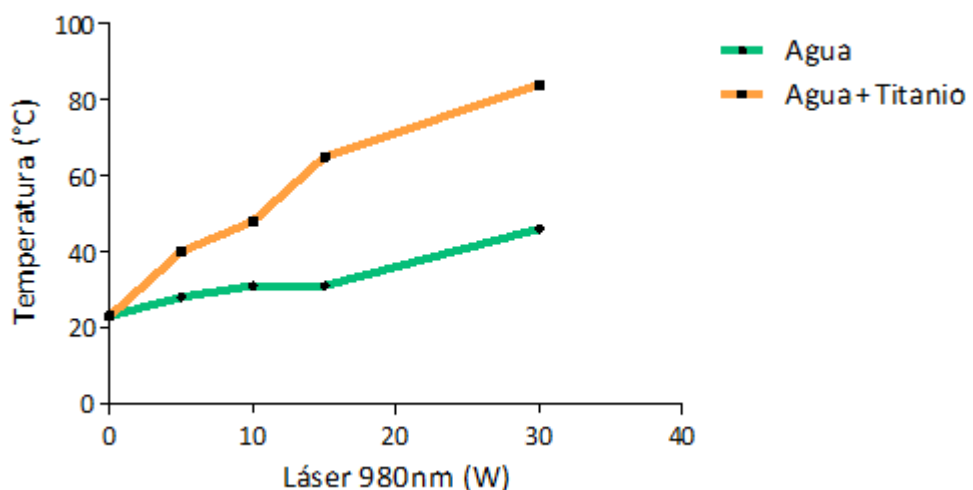


Figura II.6 Efecto fototérmico de la irradiación con láser de 980 nm. Se realizó un tratamiento con un láser de 980 nm a distintas potencias y durante un tiempo de 10 seg., sobre Placas de titanio 1 cubiertas con agua o sobre agua sola colocadas sobre pocillos de placas multiwells.

II.3.2 Efecto del láser de 980 nm sobre biopelículas de *E. faecalis* formadas sobre titanio (terapia fototérmica)

La viabilidad de las bacterias de *E. faecalis* crecidas sobre Placa A de titanio se determinó luego de la irradiación con distintas potencias del láser de 980 nm durante 10 seg a 20 W, 25 W y 30 W. Este láser emite en el infrarrojo, por lo cual no genera

ningún tipo de efecto fotodinámico sino que el efecto bactericida estaría dado exclusivamente por calentamiento de la biopelícula a ser tratada.

Para cada potencia analizada se observó una disminución estadísticamente significativa de las UFC/ml por efecto de la terapia fototérmica respecto al control no irradiado (Figura II.7 A, B y C). Sin embargo, la reducción en la viabilidad bacteriana fue similar e independiente de las tres potencias del láser utilizadas (Figura II.7.D).

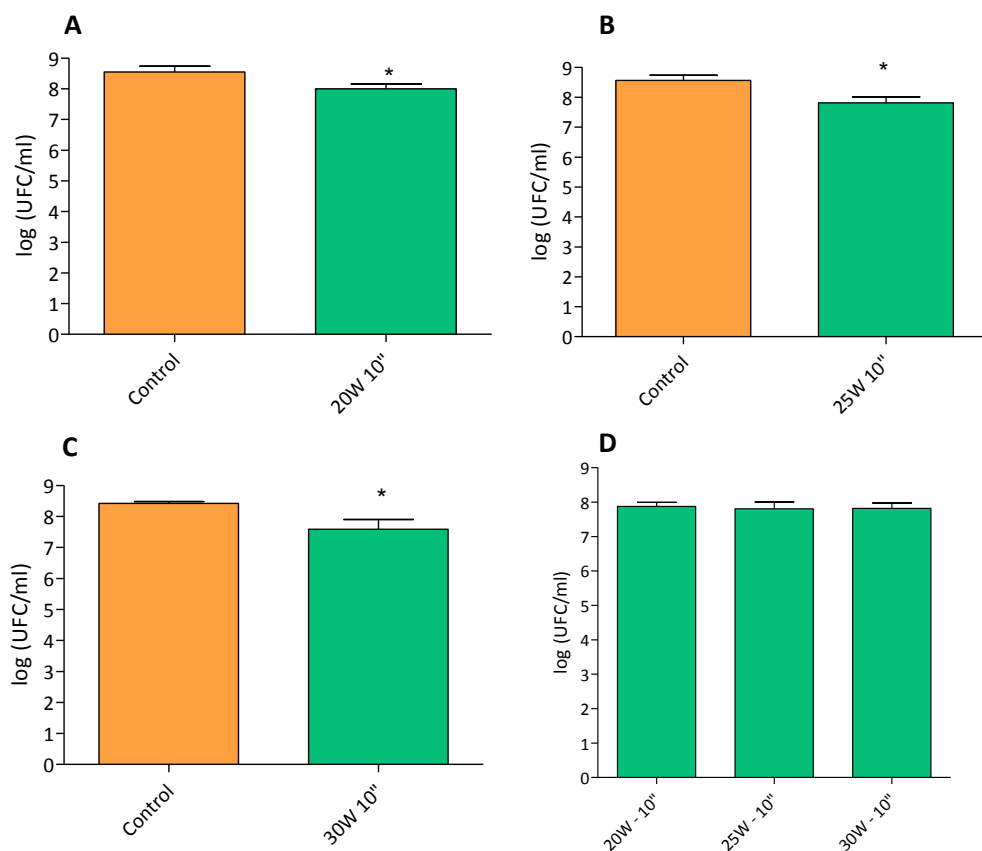
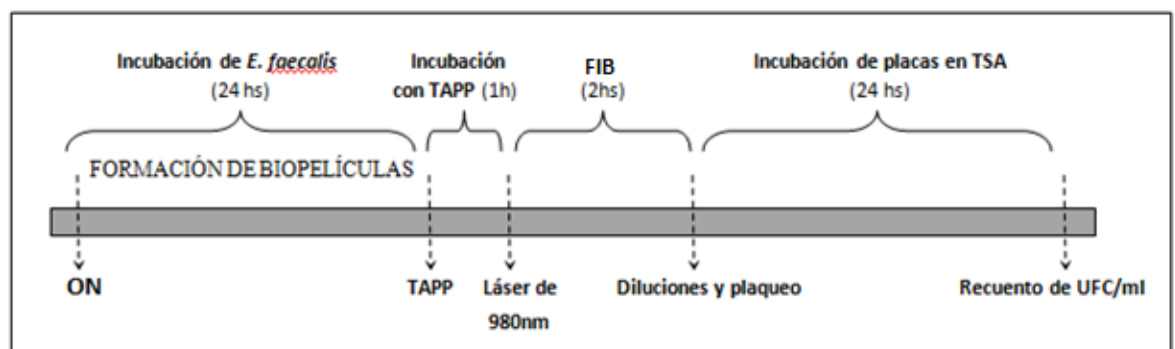


Figura II.7 Efecto fototérmico del láser de 980 nm a distintas potencias sobre la viabilidad de *E. faecalis*. Biopelículas formadas sobre Placa A de titanio preincubadas con TAPP 2,5 μM fueron irradiadas durante 10" con distintas potencias provenientes del láser 980 nm. En todos los casos la comparación entre el control y el láser a (A) 20 W, (B) 25 W y (C) 30 W resultó significativa ($p < 0,05$). (D) Comparación del efecto fototérmico generado por el láser con tres potencias distintas, no resultó significativa ($p > 0,05$).

II.4 Tratamiento fototérmico en combinación con TAPP-FIB en biopelículas de *E. faecalis* adheridas a placas de titanio

Con el objetivo de comparar los diferentes tratamientos y evaluar la hipótesis de que la combinación de la terapia fototérmica con el láser de 980 nm podría pre-sensibilizar a las biopelículas para luego ser tratadas con FIB, se realizó un tratamiento fototérmico previo a la TAPP-FIB sobre las biopelículas de *E. faecalis* formadas sobre las superficies de titanio. Según el siguiente esquema:



La TAPP-FIB y el tratamiento fototérmico resultaron efectivos reduciendo la viabilidad de *E. faecalis* en comparación a los valores obtenidos en el grupo control. Por otro lado, el análisis estadístico entre los efectos generados por el láser 980 vs la TAPP-FIB permitió establecer a la TAPP-FIB como el tratamiento más efectivo ($p=0,0098$ para la comparación entre el láser 980 nm y la TAPP-FIB) (Figura II.8).

Por otra parte, los tres tratamientos que combinan la terapia fototérmica con la TAPP-FIB resultaron más efectivos en reducir la viabilidad de *E. faecalis* al compararla con la TAPP-FIB sola (Figura II.8).

Al comparar con el grupo control, la terapia combinada logró reducir la viabilidad bacteriana en 3 órdenes de magnitud. Esta disminución resulta de la sumatoria de 2 órdenes de reducción alcanzados por la TAPP-FIB y un orden de magnitud alcanzado por la terapia fototérmica. Por lo tanto, se determinó que el efecto entre la TAPP-FIB y el láser de 980 nm sería aditivo y no sinérgico (Figura II.8).

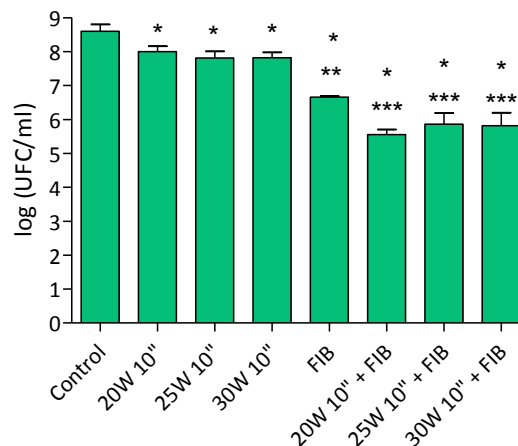


Figura II.8 Efecto de la combinación de FIB con tratamiento fototérmico sobre la viabilidad de biopelículas de *E. faecalis* crecidas sobre placas 1 de titanio. Se irradiaron pocillos de placas multiwell conteniendo las placas 1 de titanio de manera individual con el láser de 980 nm empleando potencias de 10 W, 20 W y 30 W durante 10 seg. La FIB se realizó con TAPP 2,5 μ M y una dosis lumínica de luz visible de 165 J/cm². En los tratamientos combinados se procedió a la FIB y posteriormente se irradió con el láser de 980 nm a la potencia correspondiente. *p< 0,05 respecto al control sin tratamiento alguno, ** p<0,05 respecto al tratamiento con el láser de 980 nm a 20W, 25W y 30W respectivamente durante 10 segundos, *** p<0,05 respecto al tratamiento de FIB solo. El control corresponde a una biopelícula crecida sobre placa sin TAPP y sin irradiar.

II.4.1 Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia para documentar la viabilidad bacteriana de biopelículas de *E. faecalis* adheridas a placas de titanio y tratadas con TAPP-FIB y terapia fototérmica

Con el objetivo de reforzar los resultados obtenidos con el recuento de UFC/ml, se visualizaron las biopelículas de *E. faecalis* formadas sobre placas 1 de titanio por medio de microscopía confocal de fluorescencia luego de cada tratamiento. Para ello, se utilizó el kit BacLight LIVE/DEAD (Molecular Probes, Eugene, OR) basado en dos sondas fluorescentes de ácido nucleico que actúan como marcadores y que determinan la viabilidad o no de las bacterias. Como control de viabilidad bacteriana se

utilizaron las biopelículas sin tratamiento. Por otro lado, para obtener un control de muerte celular se agregó etanol 70% a otra de las biopelículas.

Las imágenes representativas de cada tratamiento concuerdan con el análisis realizado a partir del recuento de las UFC/ml. La fluorescencia roja (ioduro de propidio) indica el daño o muerte bacteriana mientras que la fluorescencia verde se debe al fluorocromo SYTO9, que marca las células viables (Figura II.9).

En el control +TAPP- Iluz (Figura II.9.B), se observa predominancia de fluorescencia verde, aspecto cualitativo que evidencia ausencia de citotoxicidad del FS utilizado. Las imágenes obtenidas luego de realizar la TAPP-FIB y la terapia combinada (Figura II.9 D y E, respectivamente), son similares a las obtenidas con el control de muerte celular logrado con el etanol puro (Figura II.9 F). También es posible observar las diferencias cualitativas entre el tratamiento fototérmico con el láser de 980 nm y el tratamiento de TAPP-FIB; en este caso también es posible reconfirmar que el segundo tiene un efecto más eficaz que el primero ya que en esta imagen se encuentra la mayor señal de fluorescencia roja (Figura II.9 C y D), indicando la predominancia de bacterias no viables.

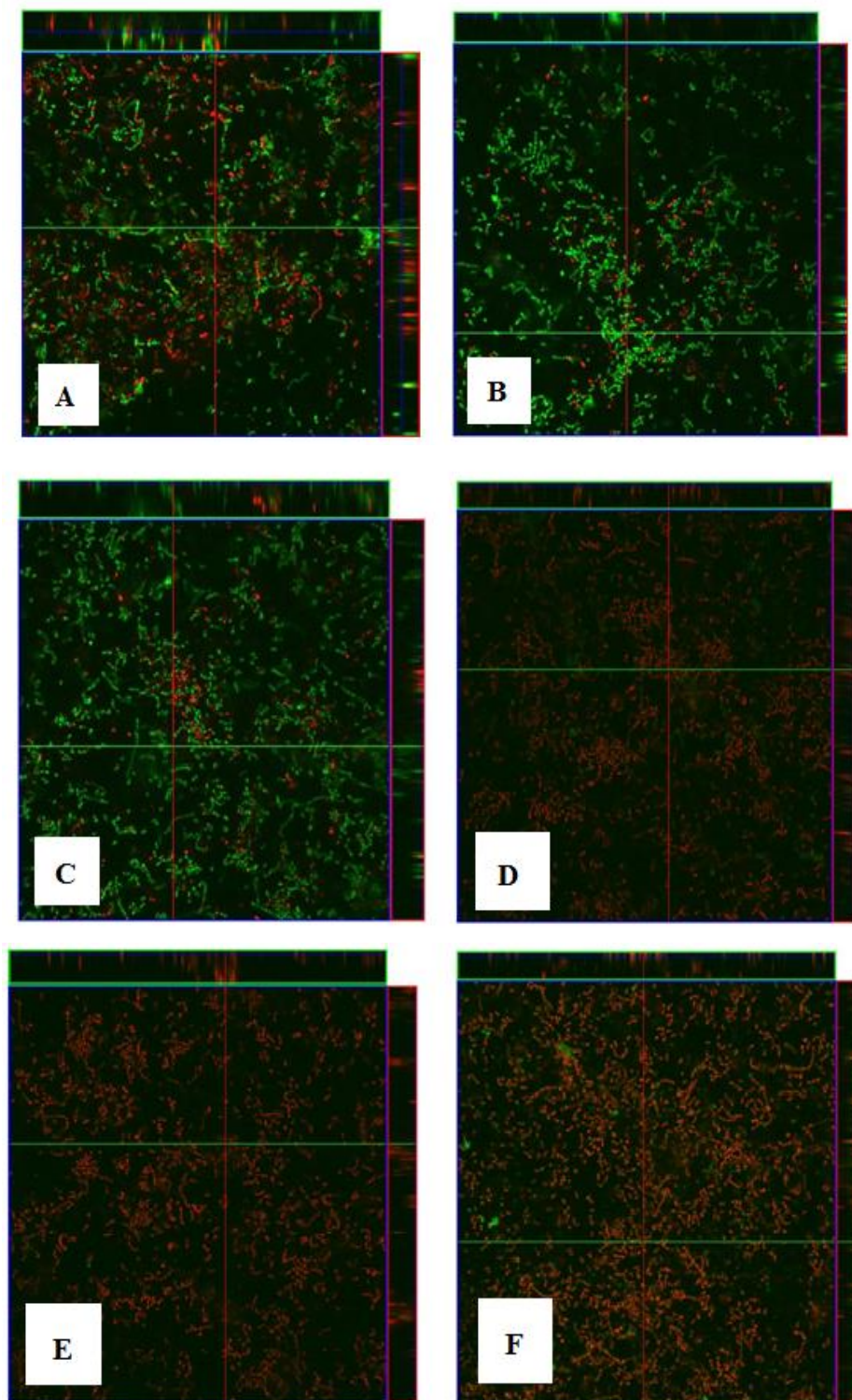


Figura II.9 Viabilidad de biopelículas de *E. faecalis* crecidas sobre Placa A de titanio luego de los tratamientos fototérmico y TAPP-FIB. (A) Control, (B) Control incubado en oscuridad con 2,5 μ M de TAPP durante 1 h pero sin irradiar, (C) Tratamiento con el láser de 980 nm (30 W 10"), (D) TAPP-FIB, (E) Tratamiento combinado: Láser de 980 nm (30W 10") + TAPP-FIB. (F) Control de muerte.

II.5 Pre-tratamiento fototérmico y TAPP-FIB de biopelículas de *S. epidermidis* y *S. aureus* sobre placas de titanio

Para determinar si este tratamiento combinado es efectivo contra otras cepas bacterianas Gram positivas, se trabajó con biopelículas de 24 h de desarrollo de *S. epidermidis* y de *S. aureus* crecidas sobre Placa A de titanio. Tanto en las biopelículas de *S. epidermidis* como en aquellas formadas por *S. aureus*, la TAPP-FIB redujo un orden de magnitud la supervivencia bacteriana. Sin embargo, el pre-tratamiento con láser 980 nm resultó más efectivo sobre la biopelícula de *S. aureus* al reducir adicionalmente la viabilidad bacteriana en un orden de magnitud (Figura II.10).

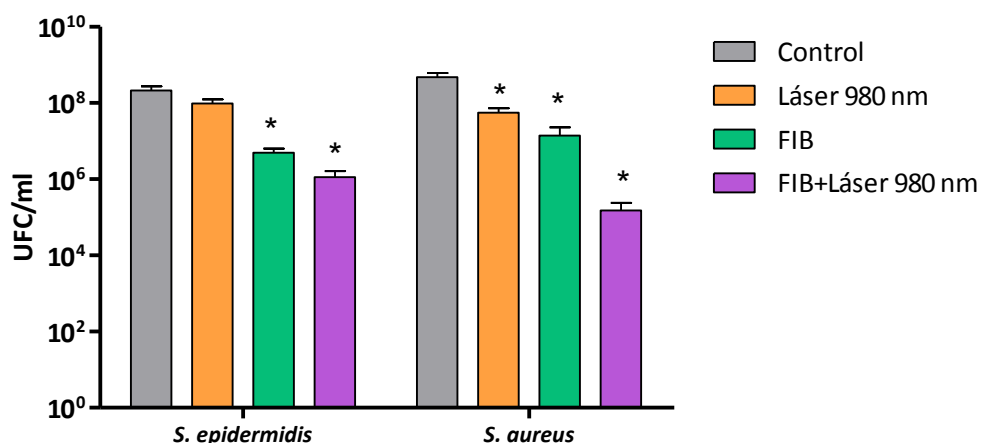


Figura II.10: TAPP-FIB en combinación con tratamiento fototérmico en biopelículas de *S. epidermidis* y *S. aureus*. FIB (165 J cm^{-2}) con TAPP $2,5 \mu\text{M}$ y pre-tratamiento con láser de 980 nm (30W 10 seg) de biopelículas de *S. epidermidis* y *S. aureus*. * $p < 0.05$ respecto al control.

II.6 Discusión

En este capítulo se ha desarrollado el estudio de una posible terapia alternativa frente a las terapias antimicrobianas convencionales asociadas a infecciones orales y posteriores fracasos de implantes odontológicos.

Para llevar a cabo los estudios, se utilizó una cepa de *E. faecalis* se encuentra vinculada a procesos infecciosos asociados a infecciones endodónticas. Este coco entérico Gram positivo, anaerobio facultativo, tiene además la capacidad de formar biopelículas, lo que dificulta aún más la erradicación de la infección. Aunque hasta el momento los motivos de la difícil erradicación de las biopelículas continúan siendo investigados, se los ha vinculado a: i) la dificultad de penetración que genera la barrera de difusión química y física producida por la matriz exopolisacárida, ii) la limitación de nutrientes que enlentece la actividad de los microorganismos, iii) el desarrollo de microambientes que podrían generar efectos antagónicos sobre la acción de los antimicrobianos, iv) la activación de respuestas de estrés que generarían cambios fisiológicos de los microorganismos y el surgimiento de variantes fenotípicas inducidas por la presencia de los antibióticos (Lasa et al., 2005).

Actualmente existe una gran variedad de procedimientos que buscan alterar la topografía de los implantes teniendo como fin último aumentar el área de contacto entre pieza y hueso para facilitar así el anclaje del dispositivo (Conterno y Pazos, 2003). Sin embargo, Bürgers et al. (2010) con sus estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que la adhesión bacteriana a superficies de titanio está influenciada primariamente por la rugosidad de las mismas. Es por esto que en primer lugar se han caracterizado las superficies de titanio previamente modificadas y posteriormente se ha promovido la formación de biopelículas sobre las mismas. El análisis de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido permitió comprobar la presencia de las irregularidades superficiales, características que confirman el éxito del pre tratamiento superficial que tenían las placas de titanio. Por otra parte, tales irregularidades en las superficies de las placas de titanio no afectaron significativamente la formación de las biopelículas sobre las mismas. Las biopelículas formadas por *E. faecalis* expresan una proteína de superficie de elevado peso molecular llamada Esp que se encuentra altamente asociada a la capacidad de generar vida sésil sobre diversas superficies, entre ellas, poliestireno (Toledo-Arana et al., 2001). Esta condición compartida por todas las biopelículas crecidas sobre las superficies de titanio podría haber sido en parte la causa de los resultados obtenidos ya que se evidenció una alta capacidad por

parte de *E. faecalis* para adherirse exitosamente a los diversos sustratos irregulares estudiados. Sin embargo, es importante tener en cuenta que no todas las cepas ni las especies bacterianas responden de la misma manera a los procesos de adhesión-interacción. Se ha demostrado que cepas de *Pseudomonas aeruginosa* son incapaces de colonizar superficies que presenten una rugosidad media inferior a 1 nm, a menos que existan importantes nanoprotusiones (Truong et al., 2015).

Por otro lado, se observó un mayor el número de UFCs a tiempos de 24 h respecto a 2 h de formación de las biopelículas. Luego de la adhesión inicial y la unión de células bacterianas a la superficie, se produce la agregación, colonización y maduración de la biopelícula; esta es capaz de producir sustancias extra polisacáridicas que forman una matriz protectora y facilitadora de la comunicación celular además de la natural progresión dela división celular bacteriana (Veerachamy et al., 2014).

El análisis de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de las biopelículas formadas sobre las placas de titanio, también permitió evidenciar una cobertura bacteriana total y similar sobre cada una de ellas independientemente al tratamiento ejercido sobre la superficie (resultado cualitativo consistente con los resultados de UFC/ml), a excepción de la placa de poliestireno (referente). Esto podría deberse a que los microorganismos se adhieren más rápido a superficies hidrofóbicas no polares y de forma más lenta a los sustratos hidrofílicos como el vidrio o los metales (Donlan, 2002). Por otro lado, se puede especular que la formación de una biopelícula de mayor grosor le confiere un alto grado de fragilidad y ésta se podría haber fragmentado con la manipulación de los posteriores lavados dando como resultado una apariencia diferente al resto de las placas.

Posterior a la caracterización de las placas de titanio y biopelículas formadas, se procedió a estudiar el efecto del FS denominado TAPP, elegido para la implementación de la FIB. Bajo las condiciones experimentales utilizadas, no se observó toxicidad intrínseca de TAPP en ausencia de irradiación lumínica en ninguna concentración a excepción de 5 μ M, en la cual se determinaron diferencias significativas al compararla

con el control sin TAPP. Este efecto citotóxico de TAPP ya había sido observado en el capítulo anterior al exponer biopelículas de *S. aureus* a elevadas concentraciones del FS. También se ha reportado la capacidad de otros FS -como el azul de Toluidina- de estimular la producción de ROS en ausencia de luz en cepas mutantes *arc* de *E. coli*; el efecto citotóxico podría deberse a la capacidad del FS de desacoplar el metabolismo energético redireccionando electrones de la cadena respiratoria (Gándara et al., 2013).

Al estudiar la efectividad de TAPP en la concentración 2,5 μM se observó una disminución mayor a 2 órdenes de magnitud de las bacterias viables. Por otro lado, hemos visto en el Capítulo I que esta porfirina es capaz de fotosensibilizar también bacterias Gram negativas. Por lo tanto, la posibilidad de utilizar TAPP para diseñar protocolos asociados a la FIB es una gran ventaja si se tiene en cuenta que su efecto se extiende a los dos grupos bacterianos, condición que amplía su espectro fotosensibilizante.

Previo a su empleo como terapia fototérmica combinada con la FIB de biopelículas formadas sobre placas de titanio, se realizó el análisis del posible efecto térmico que podría tener el láser de 980 nm. Se determinó que la presencia del metal titanio produjo un importante incremento de la temperatura en comparación al control. Esto se debe principalmente a que el titanio pertenece al grupo de los metales de transición y como todos los elementos químicos que se encuentran dentro de este grupo, es un buen conductor del calor. Esto podría significar una ventaja en relación al tratamiento, ya que aplicándolo sobre el titanio no es necesario aumentar en demasía la potencia del láser para obtener temperaturas capaces de inducir la muerte bacteriana. Es de conocimiento general el hecho de que a determinadas temperaturas los microorganismos sufren daños irreversibles, especialmente en sus proteínas (Madigan et al., 2008). En el caso de *E. faecalis*, existe una tolerancia óptima a las temperaturas moderadas, condición que la ubica dentro del grupo de las bacterias mesófilas. Hay registro de que sus cepas crecen en un rango de entre 10 y 45°C y que además pueden sobrevivir a un calentamiento a 60°C durante 30 minutos. Por lo tanto, esta condición refuerza la idea de que el efecto fototérmico, sólo a altas potencias

generará consecuencias letales. Además, ciertos estudios han demostrado que la transferencia de energía a una superficie de titanio podría ocasionar cambios en la morfología de dispositivos y en la coloración de los mismos; por lo tanto, al usar un láser que opera bajo la dinámica fototérmica, lograr eficacia antimicrobiana a bajas potencias resulta una gran ventaja. Aun así el incremento de temperatura podría extenderse a todo el tejido blando periférico y lesionarlo (Kamel et al., 2014).

Al comparar el efecto del láser de 980 nm entre las distintas potencias utilizadas, no se observaron diferencias significativas; sin embargo, en todos los casos se obtuvo muerte bacteriana sin necesidad de incorporar algún agente químico. Sin bien el uso de láseres en odontología no es algo novedoso, el perfeccionamiento de la técnica ha evolucionado en los últimos años y aún no existe un protocolo definido. Usualmente, suelen emplearse láseres de Erblio (Er:YAG) con puntas específicas para utilización en contacto con el tejido a tratar y láseres de baja potencia, utilizados en laser terapia y terapia fotodinámica (Wainwright, 1998).

Luego, se procedió al análisis de FIB y su combinación con el efecto fototérmico. Se concluyó que la FIB empleando TAPP es significativamente más efectiva en la eliminación de biopelículas de *E. faecalis* sobre placas de titanio que el tratamiento fototérmico sólo. Actualmente el nuestro es el único trabajo que reporta la eficacia de la combinación de tratamientos mencionados. Existen otros estudios (Marotti et al., 2013) sugirió que la FIB es más eficaz en reducir la viabilidad bacteriana en comparación al uso de un láser sin fotosensibilizante; sin embargo se trata de un láser de emisión en el espectro visible (660 nm) y o de un efecto fototérmico. Por otra parte, ese mismo trabajo no demostró diferencias significativas entre la FIB y el uso de tratamiento convencional mediado por clorhexidina de implantes contaminados.

Finalmente, todos los tratamientos efectuados (láser de 980 nm, TAPP-FIB y la combinación de láser de 980 nm + TAPP-FIB) lograron reducir la viabilidad bacteriana, pero el mayor efecto se logró con la terapia combinada. Al realizar el análisis estadístico que permite determinar si hay interacción entre factores, se determinó que

no hubo sinergismo pero sí aditividad de la respuestas a la TAPP-FIB y a la terapia fototérmica.

Por otra parte, las imágenes obtenidas a través de microscopía confocal de fluorescencia, son consistentes con los resultados cuantitativos de las UFC/ml. Sin embargo, la tinción con el kit LIVE/DEAD debe tomarse como una herramienta cualitativa complementaria de la investigación ya que The American Society for Microbiology sostiene que para usar el término “antimicrobiano” los ensayos de las UFC/ml deben lograr una tasa de reducción de 3 log y esto sólo se puede determinar realizando un recuento de colonias post tratamientos (Cieplik et al., 2014).

En base a los resultados obtenidos, se propone a la FIB con TAPP y al pre-tratamiento fototérmico como posibles tratamientos aplicables en casos de infección de prótesis de titanio accesibles a la luz por medio de fibras ópticas. Por otra parte, el FS empleado podría posicionarse como una buena opción en el campo odontológico, ya que utilizando una baja concentración del mismo se obtuvieron efectos de muerte bacteriana. Además, el hecho de que la TAPP no tenga una coloración considerada, reduce la posibilidad de pigmentar las piezas dentarias como usualmente suele suceder con otro tipo de FS como por ejemplo el azul de Toluidina. Además, el manejo del láser de 980 nm resultó práctico para las etapas de irradiación y la fibra óptica adaptada permitió dirigir de manera eficaz la irradiación. Este tratamiento podría llevarse fácilmente a la práctica en un ámbito odontológico ya que no exige grandes instalaciones para su uso.

Un aspecto negativo a resolver asociado al tipo de tratamiento, sería el dolor que podría experimentar el paciente como consecuencia del efecto fototérmico del láser. Un anestésico local haría más accesible la exposición al mismo, pero tendrían que evaluarse las posibles interacciones con el láser, el FS y la irradiación con luces halógenas.

Las biopelículas formadas en la cavidad oral generalmente son comunidades representadas por varias especies bacterianas y en este estudio *in vitro* sólo se utilizaron biopelículas formadas por una única especie para implementar el modelo de terapia. Es entonces un aspecto importante conocer en detalle las características moleculares de las especies bacterianas que habitualmente se encuentran presentes en los fracasos de implantes dentales. Esto permitirá diseñar estrategias que se adecúen mejor a la situación clínica de cada paciente y protocolos que logren interferir con el desarrollo de estos patógenos sésiles.

Por otra parte, es importante tener en cuenta que las características topográficas que presenta cada superficie no son los únicos condicionantes de adhesión bacteriana. Se ha visto que la composición química de los sustratos también influye sobre la interacción inicial y por otro lado, la gran variedad fenotípica que poseen las biopelículas les confiere un amplio repertorio de organización cooperativa a nivel macro y microscópico (Díaz, 2011). Continuar con la exploración de materiales biocompatibles que puedan implementarse en el desarrollo de dispositivos, es una necesidad tan importante como el desarrollo de nuevas terapias que permitan erradicar microorganismos capaces de colonizarlas.

II.7 Conclusiones

En primer lugar, se corroboró que las distintas superficies de titanio con las que trabajamos no conducían a una adherencia o crecimiento diferencial de las biopelículas de *E. faecalis*. Los estudios de microscopía electrónica de barrido demostraron que las biopelículas crecidas sobre las placas de titanio se encuentran distribuidas en todo el campo, lo cual resulta esperable ya que esta cepa muestra preferencia por colonizar prótesis de este material.

Se demostró además que la TAPP-FIB es eficiente en el tratamiento antibacteriano en biopelículas de *S. aureus*, y aislamientos clínicos de *E. faecalis* y *S.*

epidermidis crecidos sobre placas de titanio. El resultado de mayor relevancia logrado, fue reducir la viabilidad de la cepa *E. faecalis* crecida de forma sésil sobre placas de titanio modificadas. El tratamiento que permitió alcanzar la reducción máxima de 3 órdenes de magnitud, fue la combinación del láser de 980 nm con la posterior implementación de la TAPP-FIB. Además, se logró aditividad de los efectos en todas las cepas empleadas, lográndose aumentar en 1 orden de magnitud la eficiencia de la FIB. Esto demuestra que el uso de terapias combinadas permite obtener aditividad en los resultados, aspecto que impulsa la búsqueda de nuevos protocolos que puedan alcanzar efectos cada vez más efectivos.

Teniendo en cuenta la preexistencia de resistencia bacteriana frente a ciertos antimicrobianos tradicionales, los resultados obtenidos indican que la FIB a partir de TAPP en combinación con tratamiento fototérmico, resulta entonces una terapia alternativa al uso de antibióticos, efectiva en la eliminación de bacterias formadoras de biopelículas sobre superficies de titanio empleadas en implantes de uso clínico. Sin embargo, son necesarios estudios en sistemas *in vivo* para proponer el uso de esta modalidad terapéutica en implantes con infecciones bacterianas.

III

Puesta a punto del sistema empleado en ALA-FIB

III.1 Puesta a punto del sistema de irradiación empleado en ALA-FIB

Como primer paso en el estudio de ALA-FIB fue necesario optimizar el sistema de irradiación y las diferentes variables para llevar a cabo la terapia. Todos los experimentos desarrollados en este capítulo fueron realizados con el aislamiento clínico de *S. epidermidis*, ya que luego, esta sería una de las cepas a estudiar. Las incubaciones e irradiaciones en la puesta a punto del sistema de irradiación se realizaron en PBS.

III.1.1 Tubos fluorescentes

En primer lugar se compararon dos sistemas de irradiación: A) conformado por 3; B) conformado por 2 tubos fluorescentes (Osram L 36W/10) que producen un espectro de luz entre 400 y 700 nm, con una radiación máxima en 600 nm. Se realizaron tratamientos de FIB con incubaciones de 1 h en oscuridad a 37°C con ALA 1 mM y ALA 2,5 mM.

Los resultados obtenidos indican que la efectividad de la terapia depende directamente del tiempo de irradiación, observándose a mayores tiempos de irradiación, mayor fotoinactivación bacteriana, aunque el efecto es más marcado y eficiente en el sistema A. Además, en ambos casos se muestra una tendencia a aumentar la sobrevivencia a ALA 2,5 mM en comparación con ALA 1 mM. En los controles irradiados sin ALA no se observó fotosensibilidad en la cepa estudiada. Al mismo tiempo, en los controles incubados con ALA pero no irradiados, no se observó muerte bacteriana, por lo que ALA no resultó tóxica en las concentraciones estudiadas (Figura II.1).

Irradiando el tiempo máximo de 60 min se obtuvo una reducción mayor en las UFC/ml empleando el sistema de 3 tubos (A), la cual llegó a un máximo de 2 órdenes de magnitud de UFC/ml (Figura II.1).

Es por esto, que a partir de estos resultados se seleccionó el sistema de 3 tubos como sistema de irradiación más eficiente, hasta el momento.

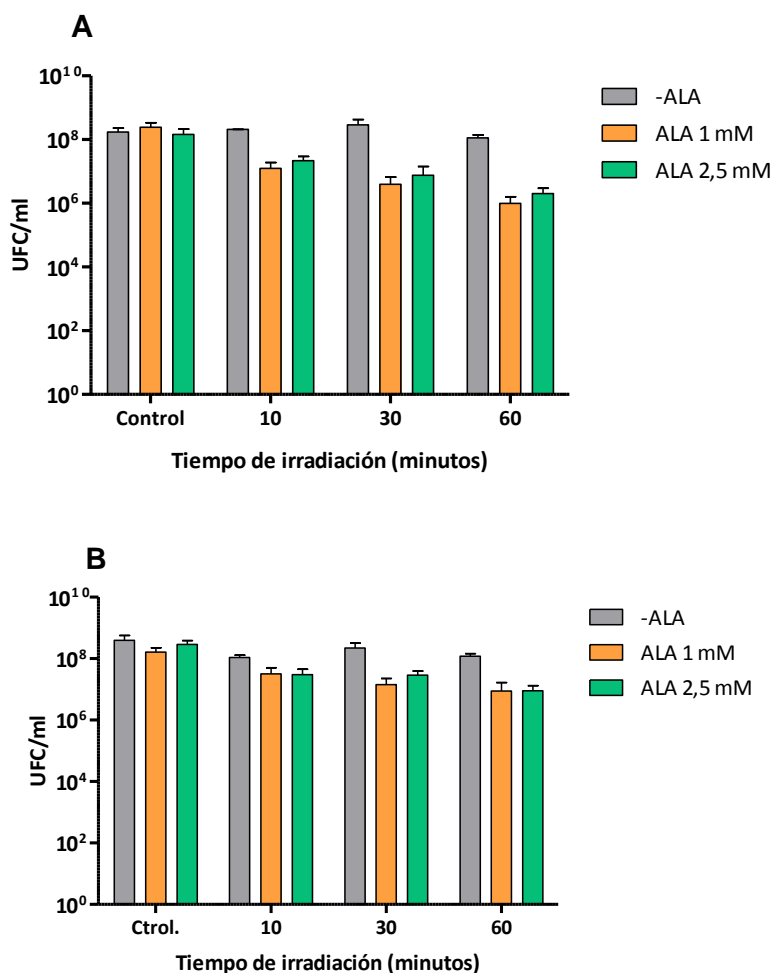


Figura III.1. ALA-FIB sobre cultivos planctónicos de *S.epidermidis* empleando dos sistemas diferentes de tubos fluorescentes. (A) ALA-FIB utilizando el sistema A de 3 tubos fluorescentes. (B) ALA-FIB con el sistema de 2 tubos fluorescentes. Se incubaron los cultivos durante 1 hora en presencia de ALA y se irradiaron a tiempos crecientes.

III.1.2 Sistema de irradiación de tubos fluorescentes vs focos halógenos

Con el fin de seguir optimizando el sistema de irradiación, realizamos ALA-FIB sobre cultivos planctónicos de *S. epidermidis*, aumentando el tiempo de exposición

a 3 h de ALA y aumentando su concentración a ALA 1 mM y 10 mM, irradiando luego durante 180 min. Se comparó entre el sistema de irradiación de tubos fluorescentes seleccionado en función al experimento anterior, y el sistema de dos focos halógenos cuyo espectro se encuentra entre 400 y 750 nm con un máximo a 600 nm (Introducción Figura 7) descripto en Materiales y Métodos.

La Figura II.2 muestra que tanto el sistema de tubos fluorescentes como el sistema de los focos halógenos producen una disminución de 4 órdenes de magnitud en las UFC/ml cuando se realiza la terapia con ALA 1 mM. A partir de estos resultados también es posible destacar, que al extremar las variables, incubando 3 h e irradiando durante 180 min , la respuesta a la terapia aumentó respecto a la fotoinactivación obtenida con tubos fluorescentes en el ítem III.1.1.

Por otro lado, la respuesta a la FIB con ALA 1 mM fue de medio orden de magnitud mayor empleando el sistema de irradiación de focos halógenos en comparación con los tubos fluorescentes (reducción máxima alcanzada de 4,5 órdenes de magnitud en las UFC/ml).

Por otra parte, empleando concentraciones de ALA de 10 mM se obtuvo una menor respuesta a la FIB que empleando 1 mM.

Como consecuencia de los resultados obtenidos, se decidió proseguir con el sistema de focos halógenos y ALA 1 mM

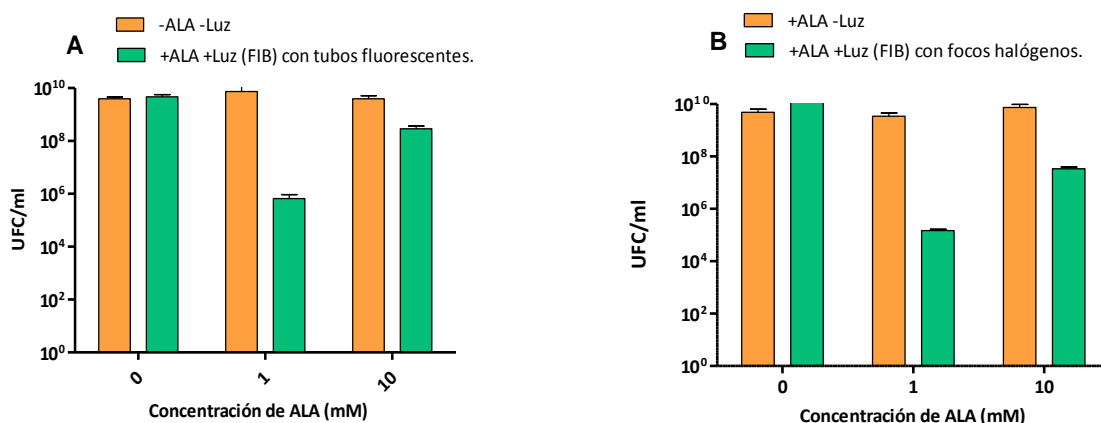


Figura III.2 ALA-FIB sobre cultivos planctónicos de *S. epidermidis*. Se incubó durante 3 h con el ALA y se irradió durante 2 h con (A) sistema de irradiación de 3 tubos fluorescentes o con (B) sistema de irradiación de focos halógenos 180 min.

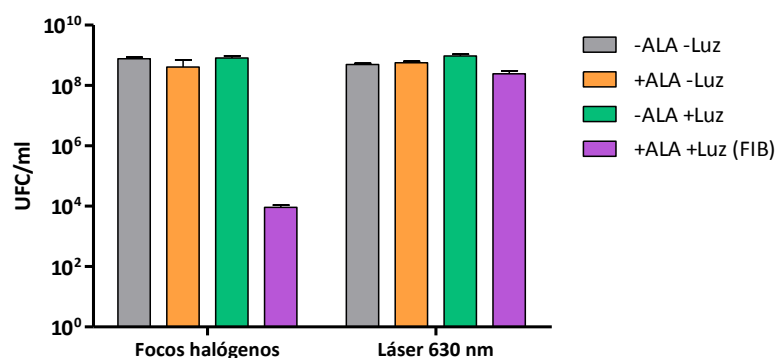
III.1.3 Sistema de focos halógenos vs láser 630 nm

Otro de los sistemas de irradiación que fue evaluado para su posible utilización en la FIB empleando ALA en cultivos planctónicos de *S. epidermidis*, fue un láser de 630 nm (Lumiia, Argentina) empleando una potencia de 200 mW por 10 min basada en trabajos anteriores (Gándara et al., 2017).

Además se aumentó el tiempo de exposición al ALA a 4 h (Figura III.3), por lo cual se observa que respecto a la Figura III.2, empleando focos halógenos, se alcanzó una mayor fotoinactivación (5 órdenes de magnitud en las UFC/ml), es decir, que mejoró la efectividad de la FIB en medio orden de magnitud de UFC/ml.

En cambio, la irradiación con 200 mW por 10 min con el láser de 630 nm no muestra una reducción significativa en la viabilidad celular.

Una vez habiendo comparado distintos sistemas de irradiación, optamos por el sistema de focos halógenos, ya que fue el que produjo una mayor respuesta a la terapia.



FiFigura III.4: ALA-FIB de cultivos planctónicos de *S. epidermidis* Se incubaron los cultivos con ALA 1 mM durante 4 horas y se irradiaron con (A) Focos halógenos por 180 min y (B) Láser de 630 nm a 200 mW por 10 minutos.

III.2 Puesta a punto del medio de incubación e irradiación empleado durante la FIB

Teniendo en cuenta que las condiciones de cultivo pueden afectar la síntesis de porfirinas a partir de ALA en bacterias, se decidió también comparar posibles medios en los cuales realizar la terapia, para lo cual se empleó el medio de cultivo TSB y PBS.

III.2.1 Medio empleado durante la irradiación

Luego de incubar a tiempos crecientes en oscuridad a 37°C con ALA en PBS, se centrifugaron las muestras y se resuspendieron en PBS o TSB y se procedió a la irradiación con el sistema de irradiación seleccionado, focos halógenos, durante 180 min.

Se obtuvo una reducción de 5 órdenes de magnitud en las UFC/ml en la ALA-FIB con una incubación de 4 h e irradiación en PBS como medio de cultivo, correlacionándose con los resultados obtenidos en III.1.1 y III.1.2. Al igual que lo ya deducido en los experimentos anteriores, en la Figura III.4.A también se puede observar que la respuesta a la terapia aumenta en función del tiempo de incubación.

Sin embargo, cuando se irradió en TSB como medio de cultivo, se obtuvo una disminución de 1 orden de magnitud en las UFC/ml hasta 3 h de incubación, obteniéndose un máximo de fotoinactivación de 2 órdenes de magnitud al incubar 4 h (Figura III.4.B).

Teniendo en cuenta estos resultados, para las irradiaciones realizadas en la ALA-FIB se escogió el PBS.

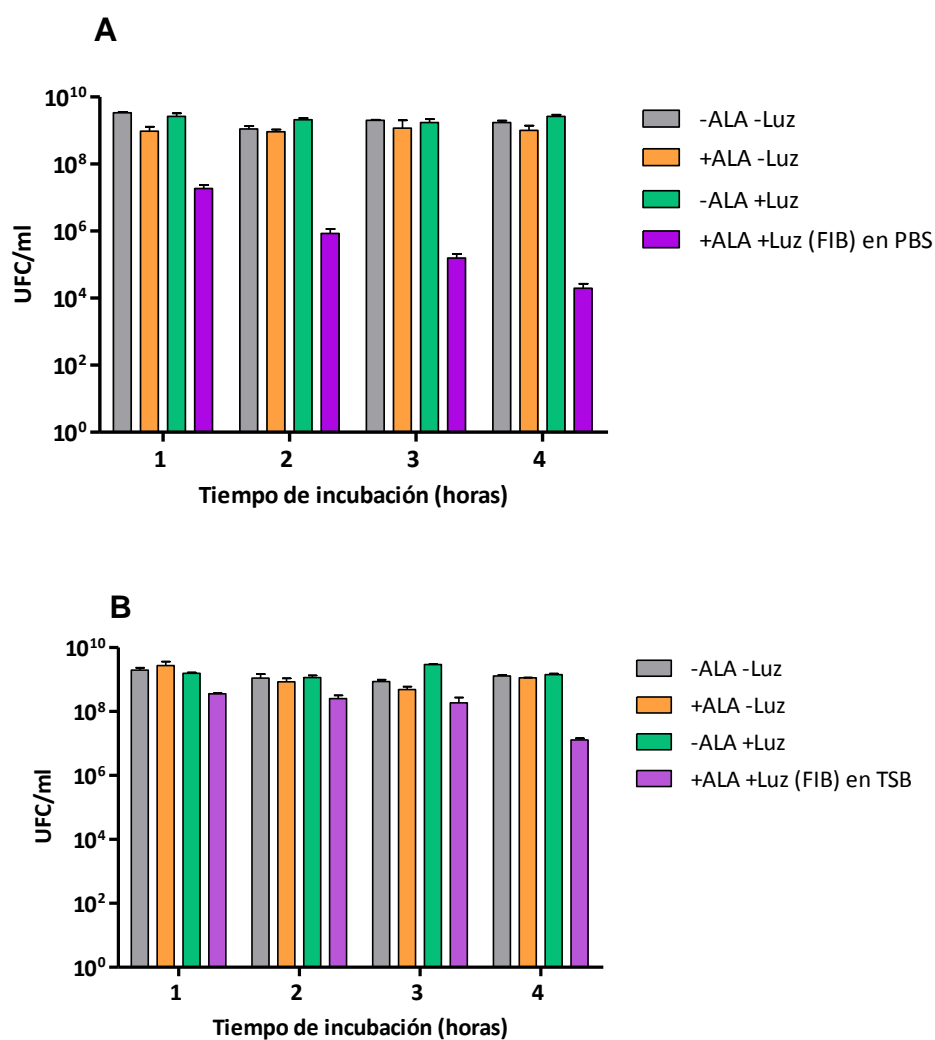


Figura III.4 ALA-FIB sobre cultivos planctónicos de *S. epidermidis*. Se incubaron los cultivos durante tiempos crecientes en PBS con ALA 1 mM y se irradiaron en PBS (A) o en TSB (B) durante 180 min con el sistema de focos halógenos.

III.2. 2 Medio de incubación con ALA

Luego de haber decidido en función de los resultados anteriores, que la irradiación se realizaría en PBS como medio de cultivo, se estudiaron los medios de cultivo para la incubación (PBS o TSB). Para ello se llevó a cabo la ALA-FIB sobre cultivos planctónicos de *S. epidermidis* con ALA 1 mM, una incubación de tiempos crecientes en TSB e irradiación con focos halógenos durante 180 min (Figura III.5A).

En la Figura se observa que la terapia produjo una reducción de un orden de magnitud en las UFC/ml en comparación con el control, independientemente del tiempo de incubación en TSB. Sin embargo, en la Figura III.4.A descripta anteriormente, se había observado una reducción de 5 órdenes de magnitud en las UFC/ml al incubar ALA utilizando PBS como medio de cultivo.

Las incubaciones con TSB que se realizaron en tiempos crecientes hasta de 4 h presentan un aumento en las UFC/ml (Figura III.4.A) y en la DO a 600 nm (DO_{600}) (Figura III.4.B) en función del tiempo, lo cual no fue observado en las incubaciones en PBS.

Debido a que las UFC/ml aumentan en función del tiempo de incubación y la menor respuesta a la terapia que presentan los cultivos planctónicos de *S. epidermidis* cultivados en TSB, se decidió realizar las incubaciones con ALA en PBS.

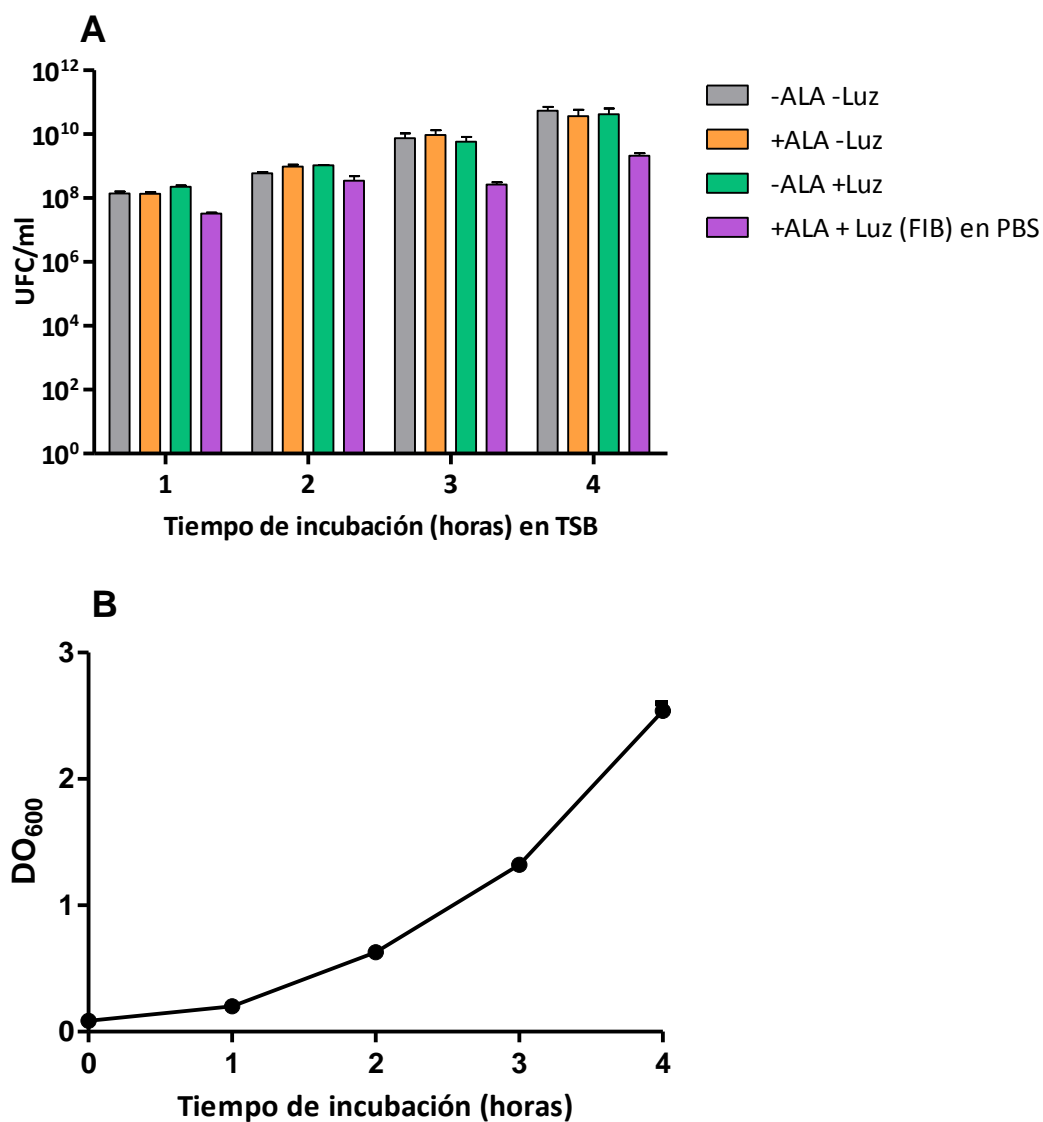


Figura III.5 (A) ALA-FIB sobre cultivos planctónicos de *S. epidermidis* incubados con ALA 1 mM a tiempos crecientes en TSB e irradiados con focos halógenos 180 min. Recuento de UFC/ml en función del tiempo de incubación. (B) Densidad óptica a 600 nm del cultivo bacteriano incubado con ALA en función del tiempo de incubación en TSB sin irradiar.

III.3 Puesta a punto de la determinación de porfirinas acumuladas en bacterias

Se realizó una extracción de porfirinas luego de incubar 4 h un cultivo planctónico de *S. epidermidis* en PBS con ALA 2 mM tal como se describió en Materiales y Métodos. Luego, se realizaron espectros emisión de fluorescencia de

dicho extracto y de los patrones de Uro, Copro y Proto en distintas concentraciones de manera de poder ver la apariencia de los espectros en distintas condiciones.

En la Figura III.6 se observa que los patrones de Copro y Uro poseen patrones similares (picos a 598 y 656 nm para Copro y a 600 y 658 nm para Uro), mientras que los picos de los patrones de Proto se encuentran desplazados hacia longitudes de onda más altas (608 y 663 nm). Por otra parte, la muestra de porfirinas bacterianas, a pesar de estar compuesta por una mezcla de porfirinas, es coincidente con el patrón de Copro. Por lo tanto, a partir de estos resultados se prosiguió a utilizar es estándar de Copro como patrón para la cuantificación de las extracciones de porfirinas. Debido a estos corrimientos que se presentan entre las diferentes porfirinas, al momento de cuantificar cada muestra se realizaron espectros de emisión y se tomaron los valores correspondientes a los picos obtenidos en la longitud de onda de mayor intensidad (598 nm).

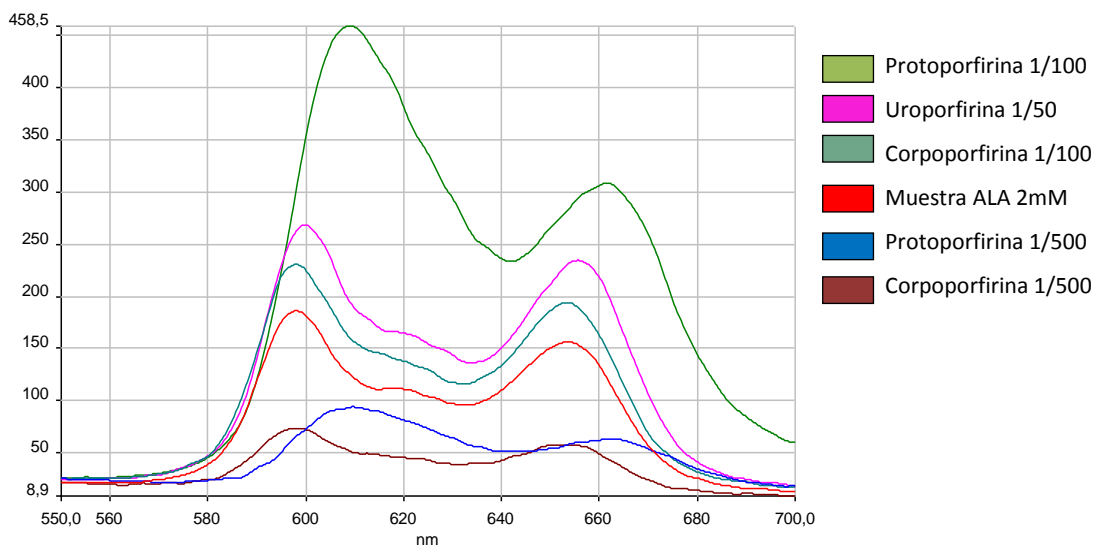


Figura III.6 Espectros de emisión de fluorescencia de distintos patrones de porfirinas y de un extracto de porfirinas bacterianas luego de una incubación con ALA 2 mM durante 4 h de un cultivo planctónico de *S. epidermidis* (muestra). Longitud de onda de excitación: 405 nm.

III. 4 Condiciones de cultivo de biopelículas

En esta sección se estudió el efecto de la adición de glucosa a biopelículas de *S. epidermidis* para luego ser tratadas con ALA-FIB. Para ello se hicieron crecer en TSB presencia o ausencia de glucosa 5% sobre poliestireno por 24 h. Se realizaron incubaciones en oscuridad a 37°C, en PBS durante 3 h con ALA 2 mM y se irradiaron en PBS con focos halógenos durante tiempos crecientes.

No se observaron diferencias en la respuesta a la terapia en biopelículas de *S. epidermidis* cultivadas en presencia o en ausencia de glucosa 5%. (Figura III.7). De acuerdo a los resultados obtenidos, se prosiguió a cultivar las biopelículas en medio sin glucosa.

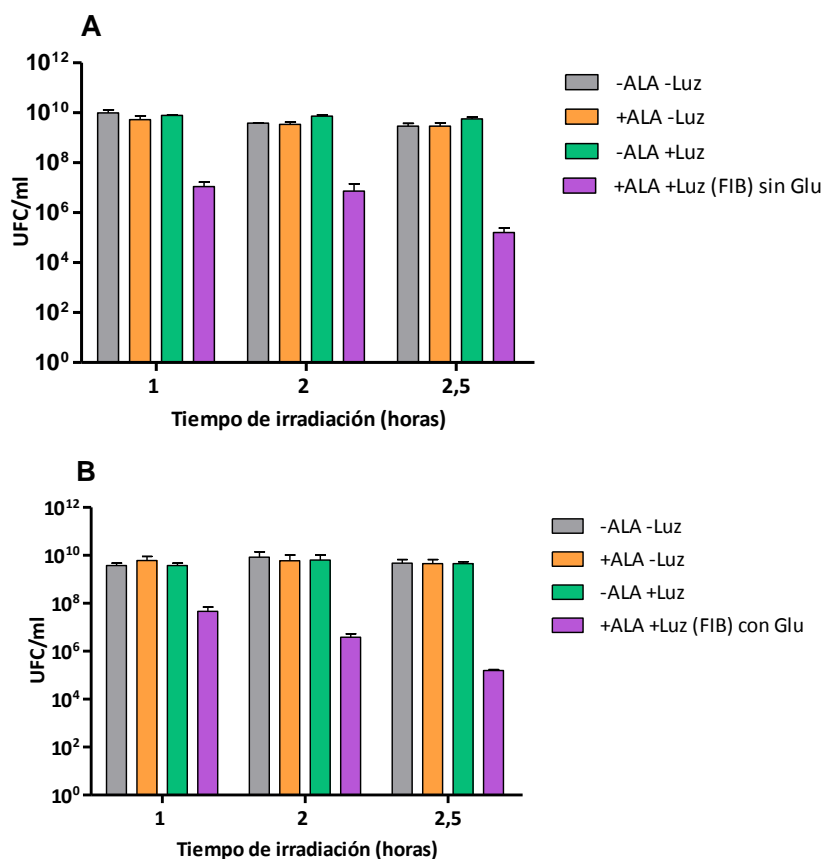


Figura III.7 ALA-FIB de biopelículas de *S. epidermidis* cultivadas en TSB A) en presencia de glucosa 5% y B) sin glucosa. Seguidamente se incubaron durante 3 h con ALA 2 mM en PBS y se irradió en PBS con focos halógenos durante tiempos crecientes.

III.5 Discusión

En principal objetivo de este capítulo fue poner a punto algunas variables de la terapia fotodinámica aplicada bacterias empleando ALA.

En primer lugar se compararon distintos sistemas de irradiación. El sistema de dos tubos fluorescentes, con una potencia de 23 mW/cm^3 , indujo una menor eficiencia que el sistema de tres tubos fluorescentes, con una potencia de 30 mW/cm^3 . Esto resulta coherente como consecuencia del aumento en la potencia de irradiación provocada por el agregado de un tubo fluorescente al sistema.

Por otro lado, los máximos de emisión de estos tubos así como de los focos halógenos, se encuentra alrededor de 600 nm, longitud de onda adecuada teniendo en cuenta los picos de absorción de las porfirinas, de manera que con los focos halógenos se obtuvo una mejor respuesta a la terapia, y esto se debe a que el segundo sistema posee una potencia mucho mayor (55 mW/cm^2), además de presentar un mayor rango de longitudes de onda y de esta forma abarcar más longitudes que puedan provocar la excitación del FS. Las porfirinas muestran una intensa absorción alrededor de los 400 nm pero como la penetración de la luz aumenta a mayores longitudes de onda, generalmente se usa la banda de absorción más débil que es la de 630 nm debido a la escasa penetración de la luz de longitud de onda más corta en los tejidos que sufren infecciones (Gomer et al., 1984).

Se ha observado que con una luz de 635 nm de longitud de onda se obtendría una mayor actividad biológica (Star et al., 1990), por lo cual decidimos estudiar el efecto de un láser de 630 nm. Sin embargo, los resultados obtenidos con el láser no fueron prometedores y el sistema de focos halógenos siguió siendo el de mayor eficiencia alcanzada, en consecuencia se prosiguió utilizando éste sistema en todos los experimentos subsiguientes. Esto puede deberse a que a pesar de la alta potencia entregada al sistema (200 mW durante 10 min), se trata de una longitud de onda única

(luz coherente) y no se abarca todo el espectro de absorción de las porfirinas como en el caso de los sistemas de luz no coherentes (lámparas).

Luego, se determinó el medio en el que se realizarían tanto las incubaciones con ALA como las irradiaciones. Esto se realizó debido a que se consideró que la terapia desarrollada en el medio TSB sería un contexto más cercano al fisiológico. Sin embargo, se buscó optimizar los experimentos *in vitro*.

La respuesta a la ALA-FIB observada en cultivos planctónicos de *S. epidermidis* luego de una incubación con ALA 1 mM en PBS e irradiadas en medio TSB, son los esperados, ya que la luz emitida por los focos halógenos no logra atravesar totalmente el medio debido a su turbidez y la energía que llega al FS no es eficiente para su excitación; es por eso que punto decidimos proseguir empleando al PBS como medio de irradiación.

En cuanto a las porfirinas sintetizadas a partir de ALA, actualmente se pueden encontrar distintos trabajos de investigación en los cuales se demuestra que la síntesis de los diferentes tipos de porfirinas es dependiente de la cepa y de las condiciones de cultivo. En una primera instancia, se tomó como válido que la ALA-FIB inducía una respuesta de reducción en la sobrevida de la cepa bacteriana, debido a la síntesis de Proto (Dietel et al., 2007; Li et al., 2013). Actualmente, se ha demostrado que las bacterias Gram positivas no sintetizan Proto y en el caso de las Gram negativas esta no es la porfirina mayoritaria (Dailey et al., 2007). Es por esto que fue necesario realizar los espectros emisión de fluorescencia, con el fin de definir un patrón con el cual cuantificar las porfirinas extraídas, que posteriormente fueron identificadas por HPLC.

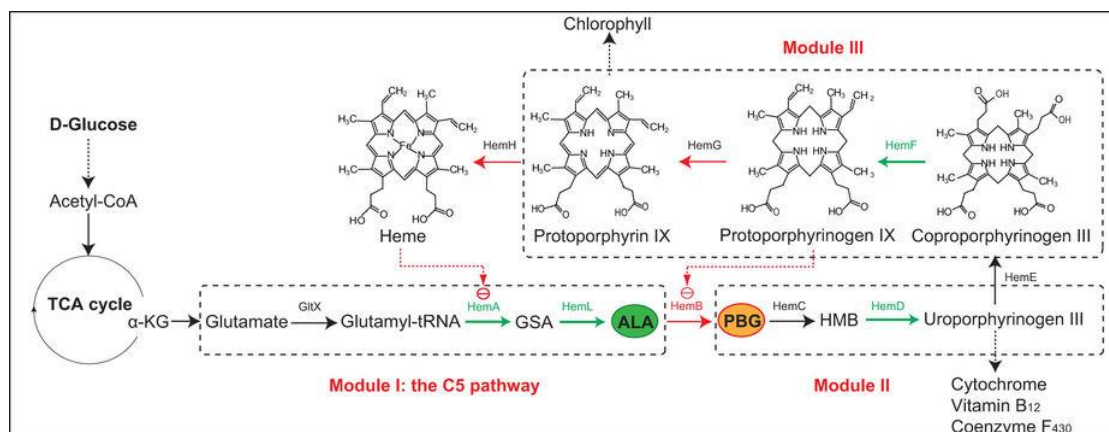


Figura II. 8 Ilustración del mecanismo de regulación de la ruta metabólica del Hemo en *E. coli*. La ruta está dividida en 3 módulos (módulo I, II y III en las rectángulos punteados). Las flechas en verde y en rojo representan las enzimas que afectan positivamente o negativamente la acumulación de ALA, respectivamente. Las flechas punteadas en rojo representan el “feedback” de inhibición. α-KG: α-ketoglutarato, GSA: glutamato-1-semialdehído, PBG: porfobilinogeno, HMB: hidroximetilbilano, GltX: glutamil-tRNA sintetasa, HemA: glutamil-tRNA reductasa, HemL: glutamato-1-semialdehído aminotransferasa, HemB: ácido 5-aminolevulínico deshidratasa, HemC: porfobilinogeno deaminasa, HemD: uroporfirinogeno III sintasa, HemE: uroporfirinogeno decarboxilasa, HemF: coproporfirinogeno III oxidasa, HemG: protoporfirina oxidasa, HemH: ferroquelatasa (extraído de Zhang et al. (2015)).

Por último, se estudió la diferencia en el cultivo de biopelículas de *S. epidermidis* y su respuesta a la FIB en ausencia o presencia de glucosa. Hasta este momento, se había reportado que la presencia de glucosa en el medio de cultivo de las biopelículas podría favorecer la formación de la misma (Argawal y Jain, 2013; Hsu et al., 2015). Son varios los estudios que hacen referencia a biopelículas bacterianas cultivadas en presencia de glucosa (Barra et al., 2005; Aswathanarayan y Vittal, 2014). Sin embargo, en esta cepa bacteriana estudiada para poner a punto las condiciones, no obtuvimos diferencias en la formación de la biopelícula y en su respuesta a la FIB.

En cuanto al medio de cultivo empleado para la ALA-FIB, varios autores demuestran la influencia del mismo en la síntesis de porfirinas, ya sea en la cantidad total sintetizada o en su perfil. Estas dependencias pueden deberse al pH (Luppa et al., 1993), a la temperatura (Ramstad et al., 2005), a la presencia o ausencia de oxígeno

(Jacobs et al., 1969) y a los tiempos de incubación (Dietel et al., 2007). Esta última variable será estudiada extensamente en el próximo capítulo. Además, Zhang et al. (2015) investigaron la ruta metabólica del hemo en *E. coli* (Figura III.8). Al ser un precursor de la síntesis del ALA, la glucosa parecería ser un buen candidato para exacerbar la síntesis de porfirinas. También se ha demostrado en células de mamíferos que el agregado de glucosa en el medio de incubación promueve la síntesis de Proto y disminuye la síntesis de Uro y Copro (Dietel et al., 1996). La disminución de Proto en ausencia de glucosa observada en el mismo trabajo, en este no sería aplicable, dado que hasta el momento no hay reportes que indiquen la síntesis de Proto en bacterias Gram positivas, como *S. epidermidis*.

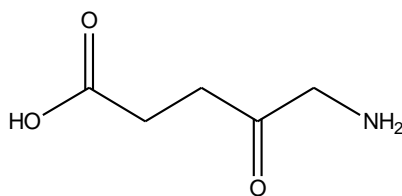
Por otra parte, los resultados obtenidos en la ALA-FIB de bacterias en crecimiento planctónico en medio TSB, demuestran el inconveniente que presenta realizar la terapia con un medio que promueve el crecimiento bacteriano durante la incubación, debido a los tiempos largos que requiere la misma. Esto puede ser explicado, además de por la distinta tasa de crecimiento que tienen las bacterias en TSB y en PBS, y en consecuencia un metabolismo más o menos activo en distintas rutas metabólicas, por la síntesis diferencial de distintas porfirinas en las distintas condiciones de crecimiento.

III.6 Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en este capítulo, y con el fin de optimizar los resultados subsecuentes, se propone como protocolo óptimo de trabajo para la ALA-FIB, irradiación con el sistema descrito en Materiales y Métodos de focos halógenos; en el caso de cultivos planctónicos utilización de PBS como medio de incubación en todas las etapas del tratamiento y en cultivos de biopelículas, medios carentes de glucosa.

IV

Fotoinactivación de cultivos planctónicos y biopelículas bacterianas empleando ácido 5-aminolevulínico



ALA

IV.1 Fotoinactivación bacteriana de cultivos planctónicos de bacterias Gram positivas *S. epidermidis* y *S. aureus*

Dada la importancia de realizar la ALA-FIB en condiciones óptimas, en una primera etapa se pusieron a punto las condiciones de tiempo y concentración de ALA a emplear en las dos cepas en estudio, y asimismo, se optimizó la dosis de luz.

IV.1.1 Influencia de la concentración de ALA en la fotoinactivación de cultivos planctónicos de bacterias Gram positivas

Como una primera aproximación, y en base a estudios preliminares, se tomaron los tiempos de 4 h para la exposición de *S. epidermidis* a ALA y de 2 h para la exposición de *S. aureus*.

Luego de 4 h de incubación de *S. epidermidis* con distintas concentraciones de ALA, se observó que la síntesis de porfirinas intracelulares en cultivos planctónicos alcanza su máximo en ALA 1 mM (19,4 µg de porfirinas/10¹² UFC) y esta concentración al irradiar con 142 J/cm² induce el mayor grado de muerte bacteriana (1 x 10⁹ del control vs 2,8 x 10⁴, es decir 5 órdenes de magnitud de UFC/ml). A concentraciones mayores a 1 mM, la cantidad total de porfirinas disminuye hasta mantenerse constante a valores aproximados a 14,1 µg de porfirinas/10¹² UFC. Las porfirinas extracelulares relativizadas por UFCs alcanzan valores similares a las porfirinas extraídas del medio intracelular (Figura IV.1. A).

En el caso de *S. aureus*, las bacterias se incubaron 2 h con concentraciones crecientes de ALA y se observó que el máximo de porfirinas intracelulares sintetizadas se alcanza en ALA 2 mM (43,5 µg de porfirinas/10¹² UFC) y manteniéndose luego de manera constante. La mayor fotosensibilidad obtenida con una irradiación de 142 J/cm² fue entre ALA 1 mM y 2 mM logrando una reducción de 6 órdenes de magnitud en la viabilidad celular (6,3x10⁹ del control vs 4,5x10³ UFC/ml) (Figura IV.1.B).

Cabe destacar que no se observó disminución en la UFC/ml de los controles con ALA en oscuridad, por lo cual, hasta una concentración de ALA 10 mM no resultó tóxico para estas dos cepas bacterianas.

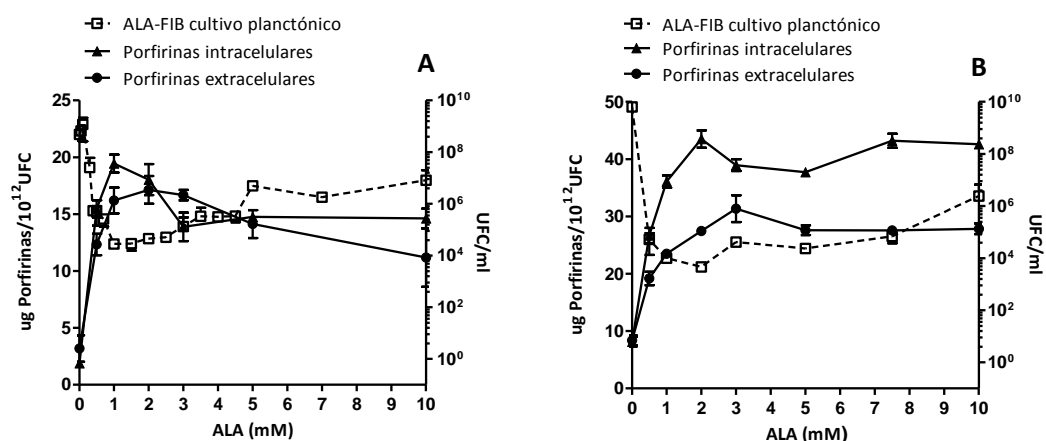


Figura IV.1: FIB en función de la concentración empleada de ALA y porfirinas sintetizadas. A) Cultivo planctónico de *S. epidermidis* incubado 4 h en oscuridad a 37°C con concentraciones crecientes de ALA e irradiado con 142 J/cm². B) Cultivo planctónico de *S. aureus* ATCC 25923 incubado 2 h en oscuridad a 37°C con distintas concentraciones de ALA e irradiado con 142 J/cm². (●) Porphirinas extracelulares y (▲) porfirinas intracelulares en el eje y de la izquierda; (■) Recuento de UFC/ml en el eje y de la derecha.

IV.1.1.1 Perfiles de porfirinas determinados por HPLC en función de la concentración de ALA en bacterias Gram positivas

En *S. aureus*, a concentraciones mayores a ALA 2 mM se observó un aumento en las UFC/ml, indicando una menor respuesta a la terapia, mientras que la cantidad de porfirinas totales sintetizadas se mantuvo constante. Por lo cual, se realizó un análisis de porfirinas por HPLC tanto en esta cepa como en *S. epidermidis*, y se obtuvieron los perfiles de las distintas porfirinas sintetizadas por cada cepa a distintas concentraciones de ALA (Tabla IV.1).

En *S. epidermidis*, el perfil de porfirinas de HPLC indica una reducción significativa en la proporción de Uro a concentraciones elevadas de ALA, una

proporción de Copro constante y valores de Hepta aumentados, junto con la aparición de dos isoformas de tetracarboxilato de la familia Isocoproporfirina que representa el 14% de las porfirinas totales, Copro es la única porfirina liberada al medio bajo ambas concentraciones, 1 y 5 mM.

En *S. aureus*, luego de 1 h de incubación con ALA 1 mM, la composición intracelular de las porfirinas muestra un patrón de distribución con todos los intermediarios porfirínicos, excepto Proto. Las proporciones disminuyen de la siguiente manera: Copro (32%)> Uro (22%)> Isocopro (21%)> Hepta (18%)> Hexa (7,5%). Después de una exposición a ALA 5 mM, la porfirina mayoritaria sigue siendo Copro (50%) seguido de Uro (39%) y una pequeña proporción de Hepta (11%), pero el resto de las porfirinas ya no se encuentran presentes.

Además, la presencia de una proporción mayoritaria de Copro (90%) es la característica más destacada de las porfirinas extracelulares, con una pequeña contribución de algunas de las porfirinas más hidrófilas en el caso de ALA 1 mM.

Tabla IV.1: Porcentajes de porfirinas sintetizadas por *S. epidermidis* y *S. aureus* a partir de ALA determinados por HPLC. Se determinaron las porfirinas intra y extracelulares obtenidas luego de una incubación de 3 h de un cultivo planctónico de *S. epidermidis* y de 1 h de un cultivo planctónico de *S. aureus*.

S. epidermidis

ALA		Uro	Hepta	Hexa	Penta	Copro	Isocopro
1 mM	Intra	71,0	6,5	-	-	22,5	-
	Extra	-	-	-	-	100	-
5 mM	Intra	47,7	14,2	-	-	24,1	14,0
	Extra	-	-	-	-	100	-

S. aureus

ALA		Uro	Hepta	Hexa	Penta	Copro	Isocopro
1 mM	Intra	21,7	18,3	7,5	-	31,7	20,8
	Extra	39,1	11,3	-	-	49,6	-
5 mM	Intra	5,8	-	-	6,5	87,7	-
	Extra	2,9	-	4,8	2,3	90,0	-

IV.1.2 Influencia de los tiempos de incubación con ALA en la fotoinactivación de cultivos planctónicos de bacterias Gram positivas

Una vez seleccionada la concentración óptima de ALA a la cual se produce la mayor fotosensibilidad en las cepas analizadas y siendo esta 1 mM, se realizaron curvas de respuesta a la FIB en función del tiempo de incubación con ALA.

En la cuantificación de porfirinas totales, tanto intracelulares como extracelulares, de *S. epidermidis* y *S. aureus* ATCC 25923 se observó que la cantidad de porfirinas sintetizadas aumenta en función del tiempo de incubación, tanto para las intracelulares como las extracelulares (Figura IV.2).

Sin embargo, en ambas cepas se observó un aumento de la respuesta a la FIB al aumentar los tiempos de incubación, hasta alcanzar un máximo en la reducción de UFC/ml, manteniéndose constante a partir de allí. Para *S. epidermidis* se obtuvo una reducción de 5 órdenes de magnitud de UFC/ml ($1,8 \times 10^9$ del control vs $2,8 \times 10^4$) a los 180 min y para *S. aureus* ATCC 25923 una reducción de 6 órdenes de magnitud de UFC/ml ($9,9 \times 10^9$ del control vs $4,1 \times 10^4$) a partir de los 30 min (Figura IV.2).

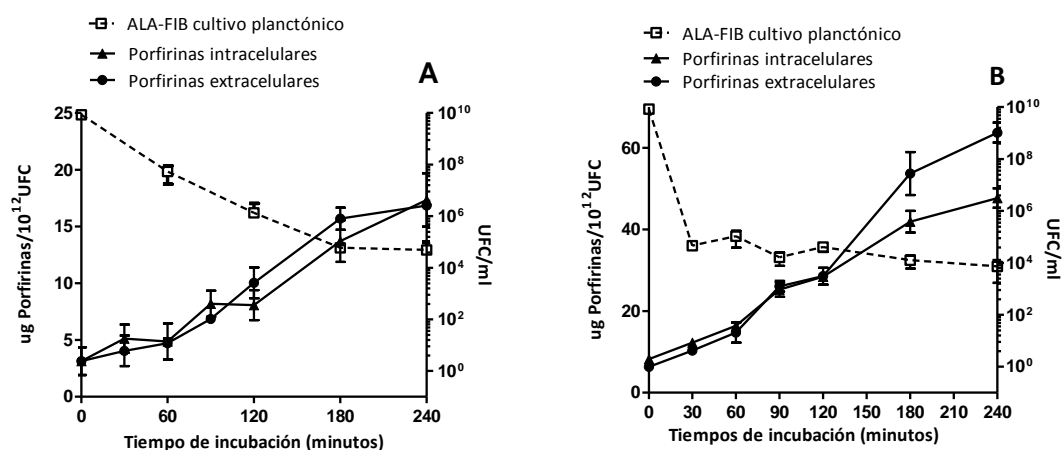


Figura IV.2: FIB en función del tiempo de incubación con ALA y porfirinas sintetizadas en cada tiempo.

A) Cultivo planctónico de *S. epidermidis* incubado en oscuridad con ALA 1 mM a tiempos crecientes e irradiado con 142 J/cm². B) Cultivo planctónico de *S. aureus* ATCC 25923 incubado a distintos tiempos en oscuridad a 37°C e irradiado con 142 J/cm². (●) Porphirinas extracelulares y (▲) porfirinas intracelulares en el eje y de la izquierda. (■) Recuento de UFC/ml en el eje y de la derecha.

IV.1.2.1 Perfiles de porfirinas determinadas por HPLC en función del tiempo de incubación con ALA en bacterias Gram positivas

Los resultados anteriores obtenidos en *S. aureus* muestran que aunque a mayores tiempos de incubación haya una mayor cantidad total de porfirinas, no se obtiene una mejor respuesta al tratamiento. A partir de 30 min de incubación con ALA 1 mM, se obtiene la misma fotoinactivación que a tiempos mayores. Por lo cual, se ha definido 1 h como tiempo óptimo de incubación para la FIB en esta bacteria. Es por esto que se realizó el análisis por HPLC (Tabla IV.2) de las porfirinas extraídas luego de una incubación de 1 h y de 3 h con ALA 1 mM, ya que a pesar de aumentar la cantidad de porfirinas, el grado de fotoinactivación permanece constante en este período de tiempo. Por otra parte, en *S. epidermidis* se realizó el análisis de porfirinas en las mismas condiciones que en *S. aureus*.

En *S. aureus*, en tiempos de incubación cortos (1 h) se muestra una tendencia a acumular intracelularmente las porfirinas más lipofílicas Copro (32%) e Isocopro (21%),

con proporciones más bajas de las hidrofílicas Uro, Hepta y Hexa, mientras que en periodos de incubación más largos (3 h), las más hidrofílicas constituyen la mayoría (Uro 44% y Hepta 31%), con proporciones menores de las más lipofílicas, Hexa, Copro e Isocopro. La acumulación de una mayor proporción de tetrapirroles hidrofílicos en tiempos de incubación más largos sugiere que estas especies de porfirinas son menos fotoactivas, ya que como se ha mencionado previamente el aumento de porfirinas totales al aumentar el tiempo de incubación, no se traduce en una mayor respuesta a la FIB .

Como un patrón general para *S. aureus*, se observa una gran proporción de Copro (90% aproximadamente) liberada al medio bajo todas las concentraciones. Mientras que a tiempos cortos de incubación (1 h) se observa una tendencia a acumular intracelularmente las porfirinas más lipofílicas Copro (32%) e Isocopro (21%) y se muestran en proporciones menores las hidrofílicas Uro, Hepta y Hexa; en periodos de incubación más largos (3 h) las más hidrofílicas se presentan mayoritariamente (Uro 44% y Hepta 31%), con proporciones menores de los más lipofílicos Hexa, Copro e Isocopro. La acumulación de una mayor proporción de tetrapirroles hidrofílicos en tiempos de incubación más largos sugiere que estas especies de porfirinas son menos fotoactivas.

IV.1.2.2 Cuantificación de ALA incorporado en las cepas Gram positivas

Debido a que la síntesis total de porfirinas en *S. aureus* es el doble de la alcanzada en *S. epidermidis*, y con el objetivo de analizar si existen diferencias en cuanto a la incorporación de ALA en ambas cepas Gram positivas analizadas, se cuantificó el ALA internalizado luego de una incubación con ALA 1 mM luego de 1 y 3 h de incubación para *S. aureus* y *S. epidermidis* respectivamente, tiempos a los cuales se obtuvo la máxima respuesta a la FIB (Figura IV.2).

S. epidermidis

Tiempo de incubación		Uro	Hepta	Hexa	Penta	Copro	Isocopro
3h	Intra	71,0	6,5	-	-	22,5	-
	Extra	-	-	-	-	100	-
1h	Intra	14,4	18,3	7,2	-	35,5	24,6
	Extra	-	-	-	-	100	-

S. aureus

Tiempo de incubación		Uro	Hepta	Hexa	Penta	Copro	Isocopro
1 h	Intra	21,6	18,3	7,5	-	31,8	20,8
	Extra	5,7	-	-	6,5	87,8	-
3 h	Intra	43,8	31,5	10,4	-	9,1	5,3
	Extra	7,5	-	-	-	87,1	5,4

Tabla IV.2: Porcentajes de porfirinas sintetizadas por *S. epidermidis* y *S. aureus* a partir de ALA determinados por HPLC. Se determinaron las porfirinas intra y extracelulares obtenidas luego de una incubación de 1 y 3 h de un cultivo planctónico de *S. epidermidis* y de *S. aureus* en presencia de ALA 1 mM

Se cuantificó una incorporación de $83,0 \pm 4,6$ pmoles de ALA/ 10^{10} UFC para de *S. aureus* y $94,3 \pm 7,3$ pmoles de ALA/ 10^{10} UFC para *S. epidermidis*.

IV.1.3 La influencia de la dosis lumínica en la ALA-FIB de cultivos planctónicos de bacterias Gram positivas

Luego de definir los parámetros óptimos de incubación y concentración de ALA tanto para cultivos planctónicos de *S. epidermidis* como de *S. aureus*, se procedió a analizar la influencia de la dosis lumínica en la respuesta al tratamiento.

En cultivos planctónicos de *S. epidermidis* se obtuvo una reducción de 5 órdenes de magnitud de UFC/ml ($3,6 \times 10^9$ del control vs $9,4 \times 10^3$ UFC/ml) a partir 71 J/cm² (Figura IV.3. A).

Por otra parte, se obtuvo una reducción de 6 órdenes de magnitud en las UFC/ml ($1,7 \times 10^9$ del control vs $3,3 \times 10^5$ UFC/ml) luego de la FIB del cultivo planctónico de *S. aureus* ATCC 25923 con una irradiación de 213 J/cm² (Figura IV.3. B).

Los controles sin ALA e irradiados no exhibieron fotosensibilidad intrínseca a las dosis lumínicas empleadas.

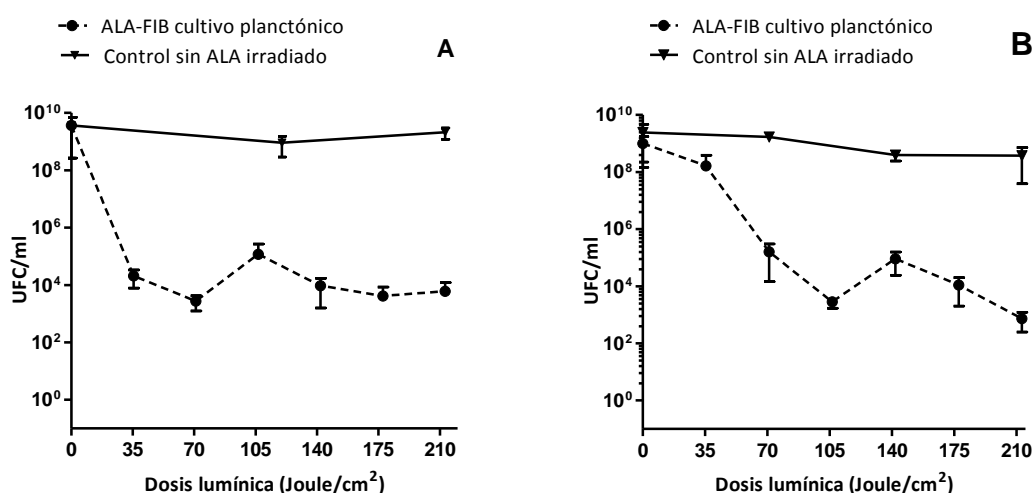


Figura IV.3: ALA-FIB en función de la dosis lumínicas creciente en cultivos planctónicos de *S. epidermidis* y *S. aureus*. A) FIB de *S. epidermidis* incubado 3 h con ALA 1 mM e irradiado. B) FIB de *S. aureus* ATCC 25923 incubado 60 min con ALA e irradiado. Se incluyeron controles sin irradiar.

IV.2 Fotoinactivación bacteriana de biopelículas de bacterias Gram positivas

IV.2.1 Influencia de la concentración de ALA en la fotoinactivación de biopelículas de bacterias Gram positivas

Teniendo en cuenta los resultados previos sobre el menor grado de fotosensibilización de las biopelículas con respecto a los cultivos planctónicos (Capítulo

l), en una primera instancia se iluminaron las biopelículas con dosis mayores a las empleadas en estos últimos.

Luego de aplicar la FIB a biopelículas de *S. epidermidis* incubadas durante 3 h con concentraciones crecientes de ALA y una irradiación de 213 J/cm^2 se obtuvo una reducción de 5 órdenes de magnitud de UFC/ml ($1,9 \times 10^9$ del control vs $8,6 \times 10^4$ UFC/ml) empleando ALA 2 mM. El máximo de porfirinas intracelulares cuantificadas se alcanzó entre ALA 0,5 mM y 1 mM manteniéndose constante a mayores concentraciones. La cantidad de porfirinas en el medio extracelular es, en promedio, 1,7 veces mayor a la cantidad de porfirinas intracelulares (Figura IV.4. A).

Por otra parte, se llevó a cabo la FIB en biopelículas de *S. aureus* ATCC 25923 irradiando con 213 J/cm^2 , empleando incubaciones de 1 h, ya que éste fue el tiempo óptimo obtenido en cultivos planctónicos y utilizando concentraciones crecientes de ALA. Se obtuvo una reducción de hasta 7 órdenes de magnitud de UFC/ml ($2,5 \times 10^9$ del control vs $5,6 \times 10^2$ UFC/ml) con ALA 2 mM. Cabe destacar, que a mayores concentraciones la fotoinactivación fue menor, es decir, la respuesta al tratamiento alcanza un valor máximo en 2 mM y luego disminuye, observándose un aumento en las UFC/ml. A concentraciones cercanas al máximo de porfirinas sintetizadas (1 mM), la cantidad de porfirinas intra- y extracelulares en esta cepa alcanza valores similares (Figura IV.4 B). Sin embargo, a mayores concentraciones de ALA los valores decaen abruptamente, manteniéndose constantes a partir de 3 mM, siendo en este caso la cantidad de porfirina

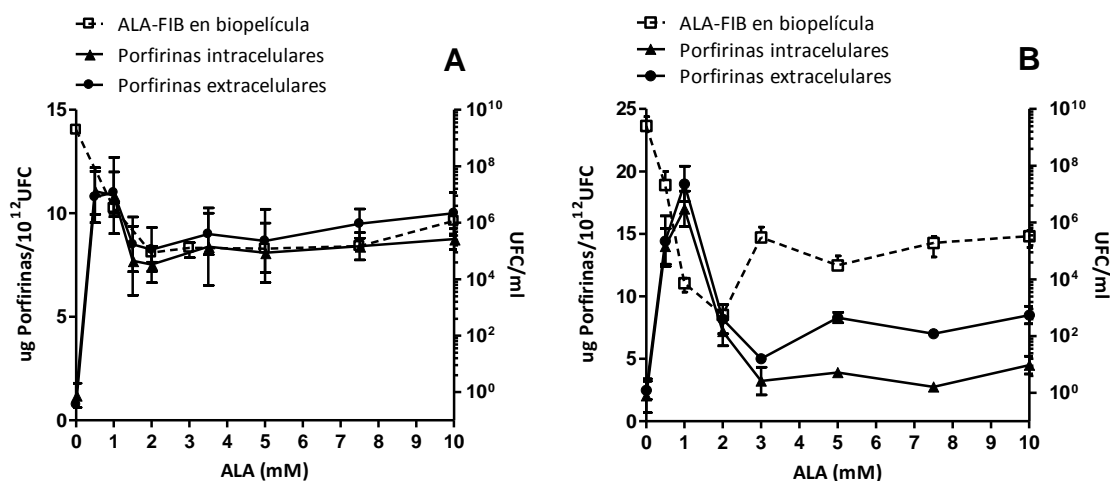


Figura IV.4: FIB en función de la concentración empleada de ALA y porfirinas sintetizadas en biopelículas bacterianas. A) Biopelículas de *S. epidermidis* incubadas 3 h con ALA e irradiadas con 213 J/cm². B) Biopelículas de *S. aureus* ATCC 25923 incubadas 1 h con ALA e irradiadas con 213 J/cm². (●) Porphirinas extracelulares y (▲) porfirinas intracelulares en el eje y de la izquierda. (□) Recuento de UFC/ml en el eje y de la derecha.

IV.2.2 Influencia del tiempo de incubación con ALA en la fotoinactivación de biopelículas de bacterias Gram positivas

Al evaluar la influencia de los tiempos de incubación con ALA, se obtuvo una reducción de 5 órdenes de magnitud de UFC/ml ($1,8 \times 10^9$ vs $2,8 \times 10^4$ UFC/ml) en la FIB de biopelículas de *S. epidermidis* incubadas a partir de 180 min con ALA 2 mM (concentración con la que se obtuvo la mejor respuesta en los resultados anteriores) e irradiadas con 213 J/cm². La cantidad de porfirinas totales sintetizadas a partir de una incubación con ALA 2 mM aumenta en función del tiempo de incubación, sin embargo la respuesta a la terapia se mantiene constante a partir de 180 min (Figura IV.5 A).

En el caso de la FIB sobre biopelículas de *S. aureus* ATCC 25923, se obtuvo una reducción de 7 órdenes de magnitud de UFC/ml ($7,6 \times 10^9$ del control vs $7,3 \times 10^2$ UFC/ml) luego de una incubación de 60 min con ALA 2 mM. Las porfirinas sintetizadas a partir de ALA 2 mM aumentan en función del tiempo de incubación y al igual que lo

observado en *S. epidermidis*, la respuesta al tratamiento se mantiene constante a partir de 60 min aunque la cantidad total de porfirinas continúa aumentando (Figura IV.5. B).

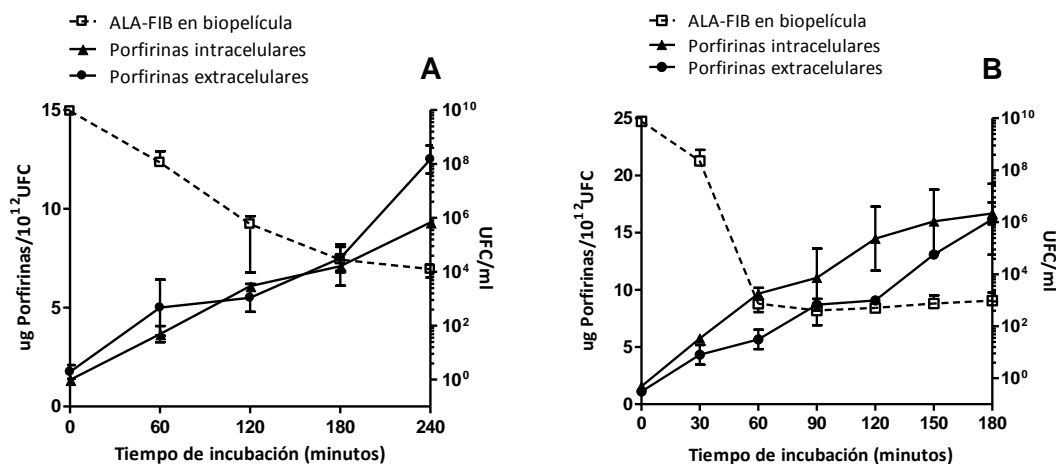


Figura IV.5: FIB de biopelículas bacterianas en función del tiempo de incubación con ALA y las porfirinas sintetizadas. A) Biopelículas de *S. epidermidis* incubadas a distintos tiempos con ALA 2 mM e irradiadas con 213 J/cm². B) Biopelículas de *S. aureus* ATCC 25923 incubadas a distintos tiempos con ALA 2 mM e irradiadas con 213 J/cm². (●) Porfirinas extracelulares y (▲) porfirinas intracelulares en el eje y de la izquierda; (□) Recuento de UFC/ml en el eje y de la derecha

IV.2.3 Influencia de la dosis lumínica en la fotoinactivación de biopelículas bacterianas Gram positivas empleando ALA

Luego de definir los parámetros óptimos de incubación y concentración de ALA para las biopelículas de *S. epidermidis* y de *S. aureus* ATCC 25923, se procedió a analizar la influencia de la dosis lumínica en la respuesta al tratamiento.

En biopelículas de *S. epidermidis* se obtuvo una reducción máxima de 5 órdenes de magnitud de UFC/ml ($4,1 \times 10^9$ del control vs $1,3 \times 10^4$ UFC/ml) cuando se irradió con 213 J/cm², luego de una incubación de 3 h con ALA 2 mM (Figura IV.6.A).

En cambio, se obtuvo una reducción de 7 órdenes de magnitud de UFC/ml ($1,9 \times 10^9$ del control vs $4,6 \times 10^2$ UFC/ml) en biopelículas de *S. aureus* ATCC 25923 con una

irradiación de 213 J/cm^2 , luego de una incubación de 1,5 h con ALA 2 mM (Figura IV.6.B).

Los controles con ALA en oscuridad no denotaron fotosensibilidad en el rango de luz estudiando en ninguna de las cepas analizadas.

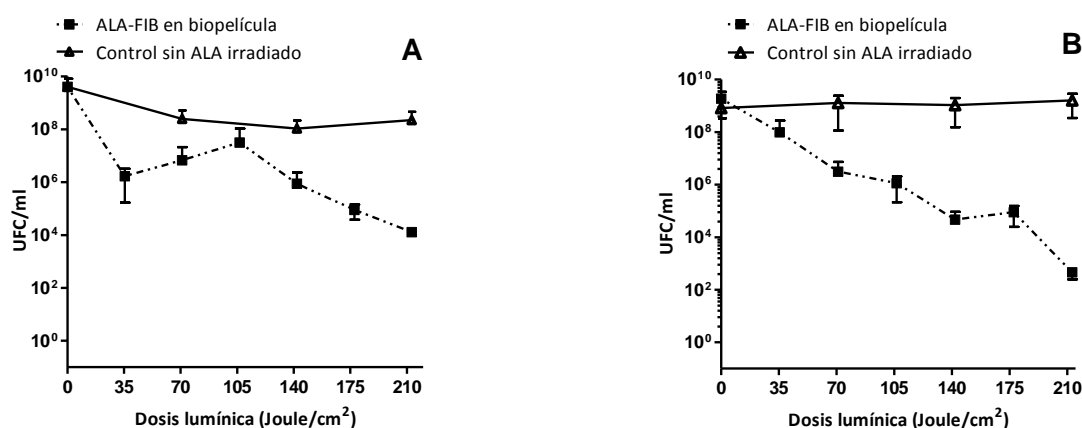


Figura IV.6: FIB con ALA y dosis lumínicas crecientes en biopelículas de *S. epidermidis* y *S. aureus*. A) FIB de biopelículas de *S. epidermidis* incubadas 3 h con 2 mM ALA e irradiadas con dosis lumínicas crecientes. B) FIB de biopelículas de *S. aureus* ATCC 25923 incubadas 90 min con 2 mM ALA e irradiadas con dosis lumínicas crecientes. (■) ALA-FIB de la biopelícula bacteriana. (Δ) Control irradiado sin ALA.

IV.2.4 Análisis de porfirinas y componentes de las biopelículas de bacterias Gram positivas por microscopía de fluorescencia

IV.2.4.1 FITC y Concanavalina A en biopelículas de *S. epidermidis*

En una primera etapa se analizó la composición de las biomasas de las biopelículas formadas por *S. epidermidis* mediante microscopía de fluorescencia. Las biopelículas de 24 h de crecimiento se fijaron con vapores de formol. El EPS se marcó con un conjugado fluorescente de Concanavalina A (ConA) unido a FITC que se une a polisacáridos que contienen residuos no reducidos de α -D-glucopiranososa, α -D-manopiranososa y α -D-fructopiranososa (Goldstein et al., 2012). Por otra parte, el amino-reactivo FITC se empleó como marcador de proteínas (Mc Swain et al., 2005). Estos

colorantes pueden unirse no sólo a los componentes del EPS sino también a las proteínas y carbohidratos dentro de las células, si las membranas han sido dañadas.

En la Figura IV.7 se muestran las imágenes obtenidas a través de un microscopio de epifluorescencia donde se observa la tridimensionalidad de la biomasa de la biopelícula de *S. epidermidis* por medio de la marcación del EPS con el conjugado ConA-FITC. Asimismo, la marcación con FITC permitió visualizar la presencia de componentes proteicos en la periferia celular que podrían estar contribuyendo a la adherencia intercelular bacteriana así como también hacia la superficie de adhesión. Adicionalmente, se visualizan los septos de las bacterias en división. Similares imágenes se obtuvieron en biopelículas de *S. aureus*.

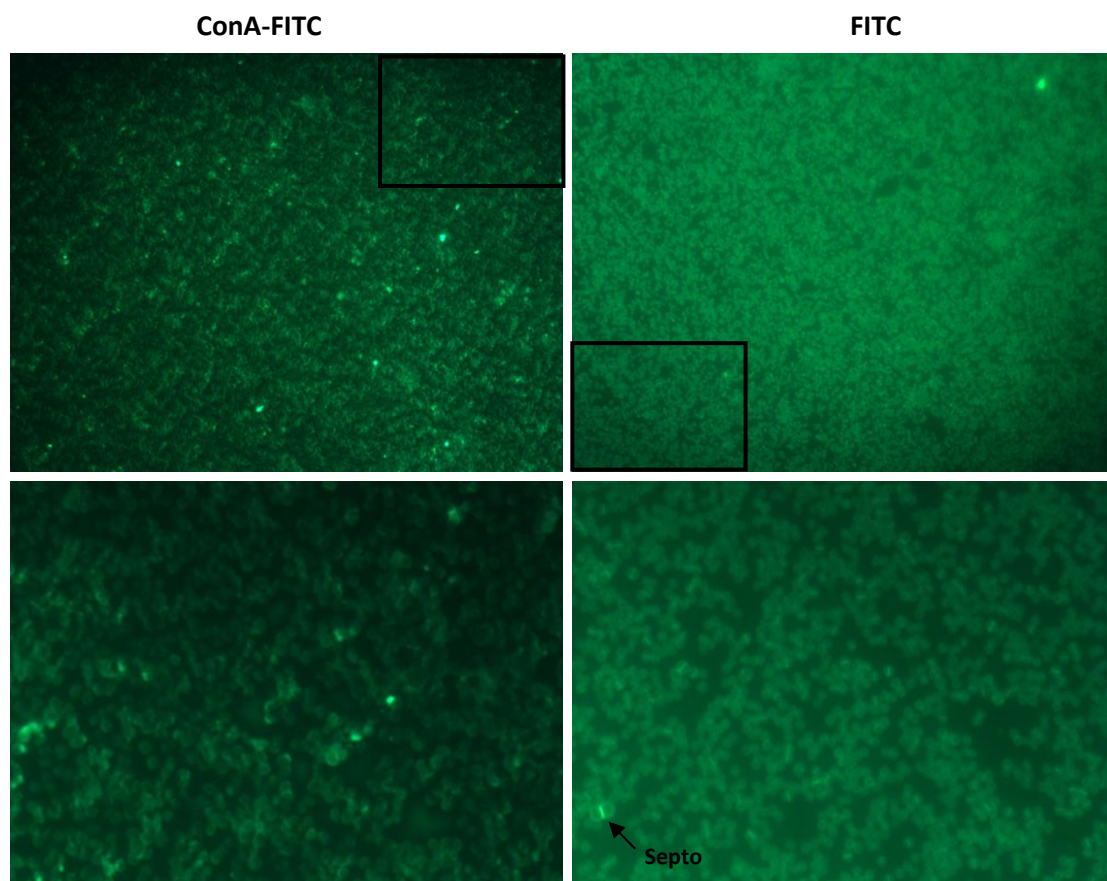


Figura IV.7. Marcación de polisacáridos de EPS y proteínas en biopelículas de *S. epidermidis* por microscopia de epifluorescencia. Biopelículas de *S. epidermidis* de 24 h de crecimiento marcadas con Concanavalina-FITC 100X (panel arriba izq.) y magnificada digitalmente (izq. abajo); y con FITC 100X (panel arriba der.) y magnificada digitalmente (abajo der.)

IV.2.4.2 CLSM de fluorescencia de biopelículas de *S. epidermidis* y *S. aureus* tratadas con ALA-FIB

Luego del tratamiento ALA-FIB se analizó el efecto sobre las biopelículas de *S. epidermidis* o *S. aureus* junto con la localización de las porfirinas allí producidas mediante CLSM de fluorescencia. Para ello, las biopelículas crecidas durante 24 h se visualizaron utilizando el amino-reactivo FITC (marcador de proteínas) y el marcador Hoechst 33342, que tiñe efectivamente todo el citoplasma bacteriano además de marcar el ADN extracelular. En las mismas muestras se visualizaron las porfirinas sintetizadas a partir de ALA teniendo en cuenta su fluorescencia roja.

En las Figuras IV.8 (biopelículas de *S. epidermidis*) y IV.9 (biopelículas de *S. aureus*) se observa que luego del tratamiento ALA-FIB se desprendieron gran cantidad de bacterias, obteniéndose apenas una monocapa con pocas bacterias al término del tratamiento. El grosor de las biopelículas de *S. epidermidis* y de *S. aureus* que no recibieron tratamiento (grupo control) correspondió a 10 y 3 μm , respectivamente. Por cierto, las marcaciones en las biopelículas control revelaron un mayor contenido proteico en las biomasas de las biopelículas de *S. aureus* en comparación con lo observado para *S. epidermidis*. Además, una fracción mayor de bacterias *S. aureus* con marcación positiva para proteínas sobrevive a la ALA-FIB en comparación con *S. epidermidis*. Este componente pareciera ser parte del EPS recubriendo individualmente las bacterias o bien se podría tratar de una marcación de proteínas intracelulares en bacterias dañadas en las que ingresó el FITC. Por otra parte, no se observa proteína extracelular luego del tratamiento ALA-FIB en *S. aureus*, mientras que sí se observa en los controles, sugiriendo que en esta especie, la acción del ALA-FIB podría estar dándose en parte por acción directa sobre el EPS favoreciendo el desprendimiento de la biopelícula. Asimismo, se observó la fluorescencia roja propia de las porfirinas en las bacterias remanentes luego del tratamiento fotodinámico de las biopelículas de ambas especies bacterianas.

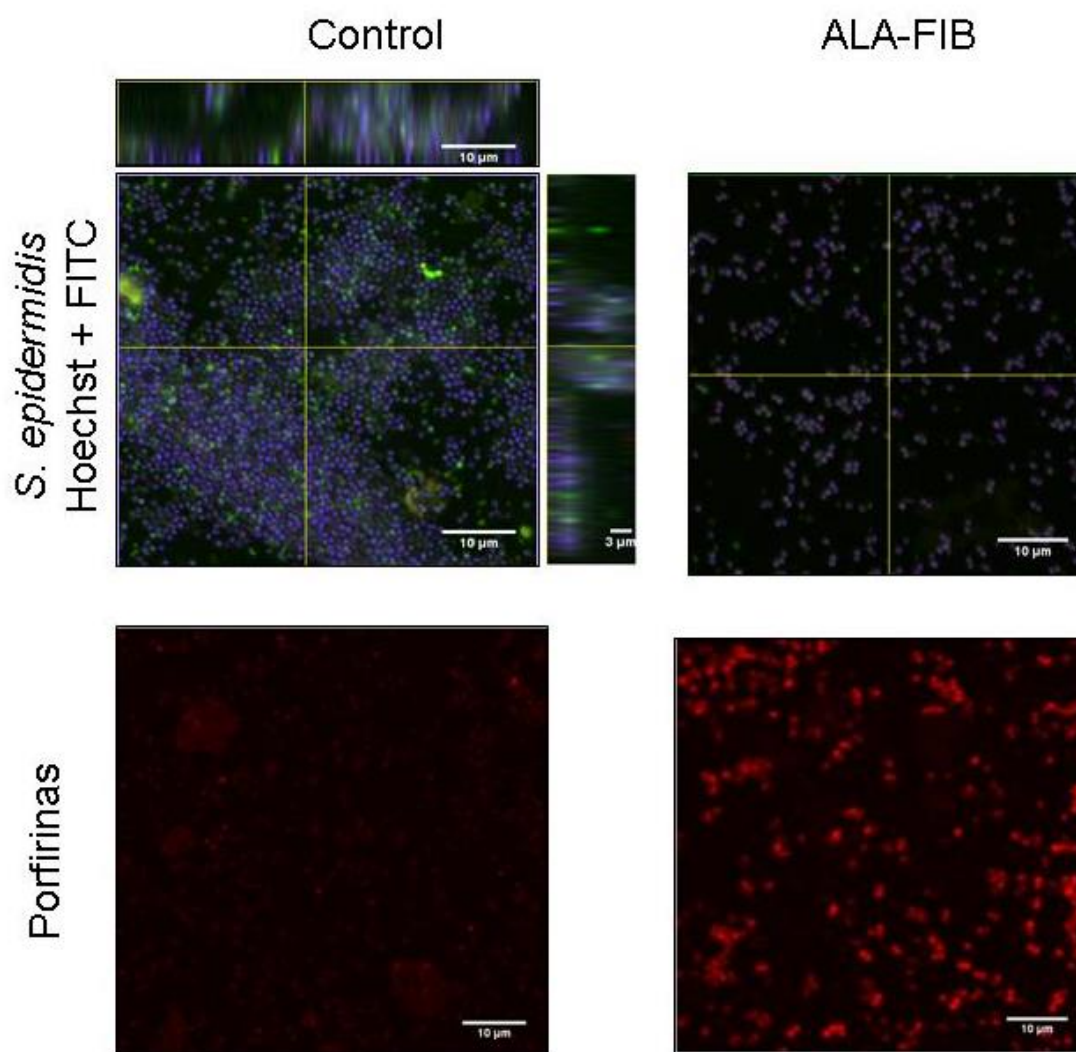


Figura IV.8: Imágenes microfotográficas de biopelículas de *S. epidermidis* incubadas con ALA y tratadas con FIB. Las biopelículas de 24 h de formación se incubaron con ALA 2 mM 3 h y se trataron FIB (213 J/cm^2) y se tiñeron con Hoechst y FITC para ser analizadas por CLSM (panel izq). Se incluyeron controles sin incubar con ALA (panel der.). Las porfirinas se visualizaron por su fluorescencia roja.

En la Figura IV.10 se muestran las imágenes obtenidas por CLSM o microscopía de epifluorescencia mediante la superposición de los canales rojo (fluorescencia de porfirinas) y verde (fluorescencia de FITC) en biopelículas de *S. epidermidis*. De este modo se pudo distinguir que en las bacterias tratadas con ALA y no irradiadas, las porfirinas ocupan todo el citoplasma bacteriano, y que la señal verde remarca las proteínas extracelulares que rodean cada célula. Por otra parte, la contratinción con ConA-FITC de las bacterias pretratadas con ALA, muestra la existencia de zonas de EPS

rodeando algunas pero no todas las células bacterianas. La tinción con el marcador de ácidos nucleicos Hoechst evidencia que las porfirinas no sólo se localizan en el citoplasma, sino que pareciese también haber una zona roja no contrateñida con azul que evidenciaría la presencia de porfirinas en la envoltura celular.

Asimismo, se puede observar que todos los componentes analizados (ADN, proteínas y EPS) son afectados por la ALA-FIB y disminuyen su existencia en forma proporcional a la reducción del número de bacterias. Las imágenes “insets” de los controles (sin ALA sin irradiación) de las biopelículas teñidas con FITC o ConA-FITC muestran los detalles observados de tridimensionalidad del EPS y de septos de bacterias en división ya descritos en la Figura IV.7.

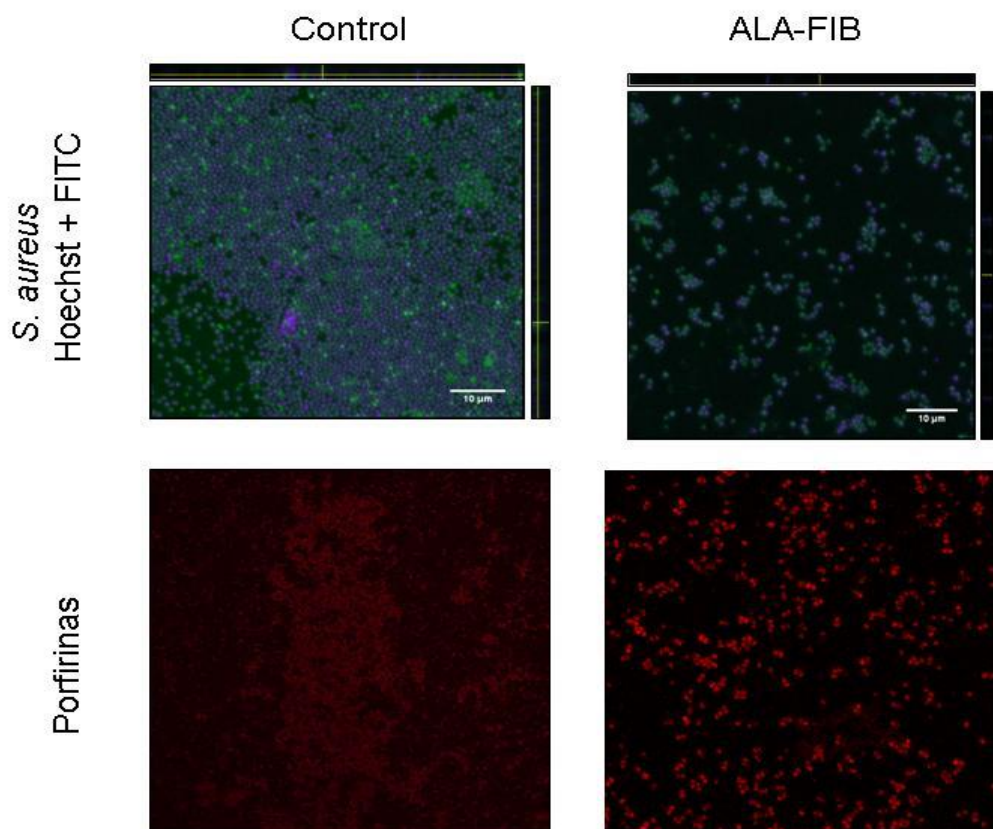


Figura IV.9: Microfotografías de CLSM de fluorescencia de biopelículas de *S. aureus* incubadas con ALA y tratadas con FIB. Las biopelículas de 24 h de formación se incubaron con ALA 2 mM 1,5 h y se trataron FIB (213 J/cm²), (panel izq). y se incluyeron controles sin incubar con ALA (panel der.) . Luego de tinción con FITC y Hoechst se fotografiaron los canales verde y UV (arriba) para visualizar dichos fluorocromos; o rojo (abajo) para visualizar las porfirinas.

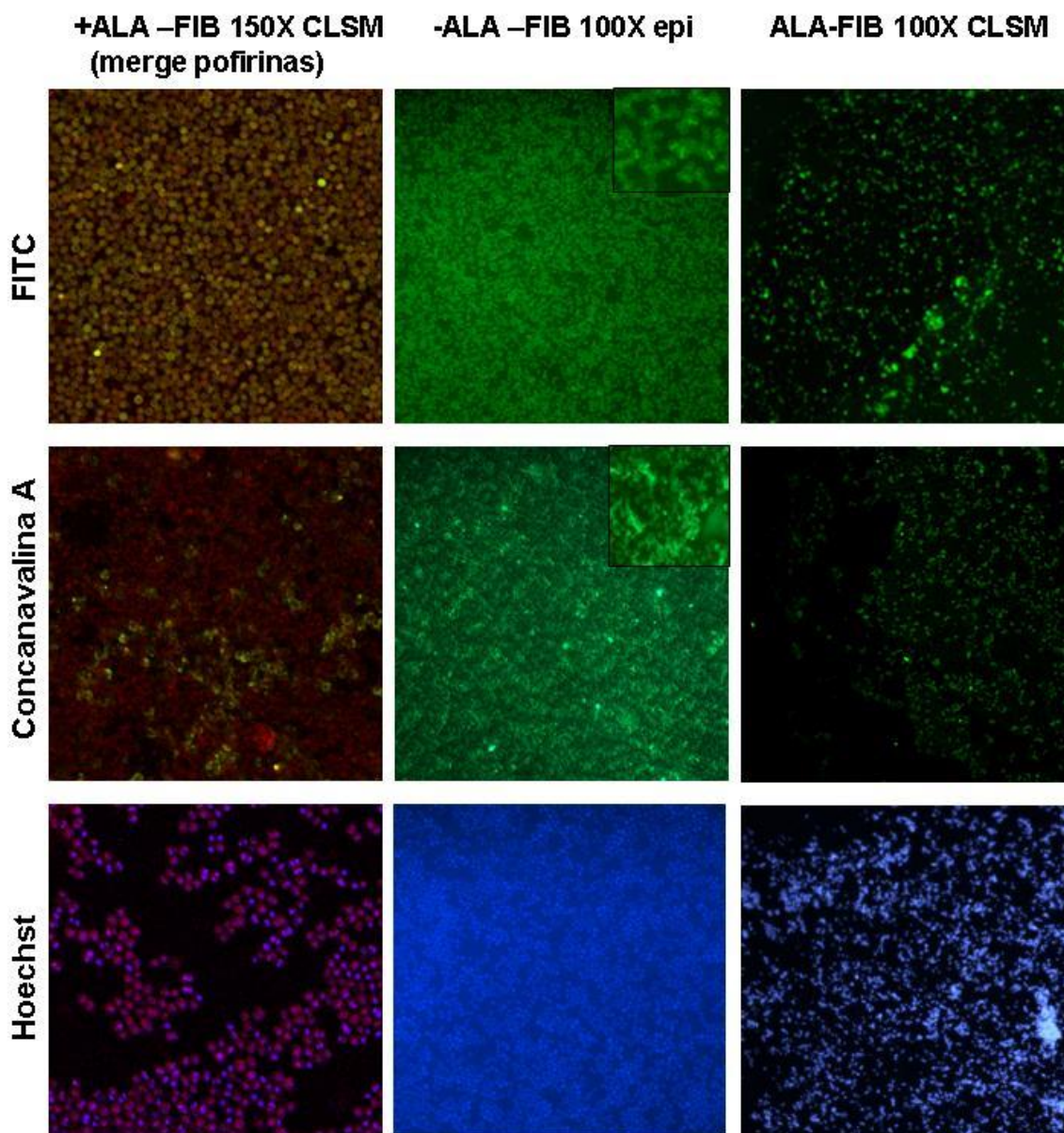


Figura IV.10: Microfotografías de CLSM de fluorescencia y epifluorescencia de biopelículas de *S.epidermidis* incubadas con ALA y tratadas con FIB. Las biopelículas de 24 h de formación se incubaron con ALA 2 mM 3 h y se trataron con FIB (213 J/cm^2), (panel der.) y se incluyeron controles sin incubar con ALA y sin luz (panel medio) e incubados con ALA –luz (panel izq.). Luego de tinción con FITC, ConA y Hoechst se fotografiaron los canales verde y UV para visualizar dichos fluorocromos; o rojo (panel izq.) para visualizar las porfirinas. Se empleó CLSM de fluorescencia (panel der.) y epifluorescencia (paneles medios e izq.) de manera de poder visualizar de la mejor manera cada muestra. Todas las fotografías se tomaron empleando un objetivo 100X y el panel izq. se magnificó digitalmente a 150X. Se incluyeron insets de FITC y ConA con magnificación digital para la mejor observación de las estructuras.

IV.3 Fotoinactivación bacteriana de cultivos planctónicos de bacterias Gram negativas *E. coli* y *P. aeruginosa*

IV.3.1 Influencia de la concentración de ALA en la fotoinactivación de cultivos planctónicos de bacterias Gram negativas

Al evaluar la influencia de la concentración de ALA en el tratamiento del cultivo planctónico de *E. coli*, no se observó una respuesta efectiva a la terapia en todo el rango de concentraciones de ALA analizado (Figura IV.12 A). Sin embargo, en el caso del cultivo de *P. aeruginosa* se observó una reducción de 4 órdenes de magnitud de UFC/ml ($2,6 \times 10^9$ del control vs $4,6 \times 10^5$ UFC/ml) a una concentración de ALA 40 mM (Figura IV.12 B). A partir de ALA 20 mM fue necesario ajustar el pH del medio para evitar los efectos tóxicos *per se* debidos al cambio del pH. De esta manera, a las concentraciones empleadas no se observó toxicidad en los controles en oscuridad.

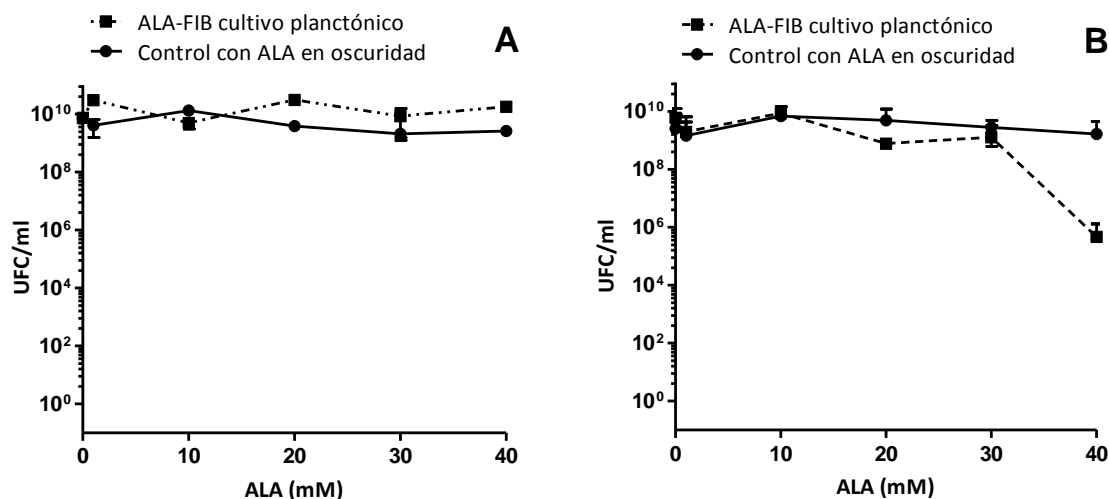


Figura IV.12: FIB en función de la concentración de ALA. A) Cultivo planctónico de *E. coli* incubado 4 h en oscuridad a 37°C con distintas concentraciones de ALA e irradiado con 142 J/cm^2 . B) Cultivo planctónico de *P. aeruginosa* ATCC 27853 incubado 4 h con distintas concentraciones de ALA e irradiado con 142 J/cm^2 . (■) ALA-FIB de cultivo planctónico, (●) Control incubado con ALA sin irradiar.

IV.3.1.1 Cuantificación de ALA incorporado en bacterias Gram negativas

En el caso de la FIB sobre cultivos planctónicos de *E. coli*, no obtuvimos respuesta a la terapia. Sin embargo, con el objetivo de indagar la causa de su resistencia al tratamiento, se decidió cuantificar el ALA internalizado con el fin de comprobar si se estaba incorporando correctamente.

Se cuantificó el ALA internalizado por cultivos planctónicos de *E. coli* y *P. aeruginosa* luego de incubaciones de 4 h en oscuridad a 37°C con ALA 1 mM, ya que la mayor respuesta a la FIB de las bacterias Gram positivas fue a esta concentración.

Se cuantificó una incorporación de 30050 ± 1523 pmoles de ALA/ 10^{10} UFC para de *E. coli* y de $540,6 \pm 25,2$ pmoles de ALA/ 10^{10} UFC para *P. aeruginosa*. Este resultado descarta la hipótesis de falta de ingreso de ALA en *E. coli* como causante de respuesta nula a la FIB.

IV.3.2 Porphirinas sintetizadas en cultivos planctónicos de bacterias Gram negativas

En cuanto a las porfirinas que se sintetizan a partir de distintas concentraciones de ALA en *E. coli*, se observó que a ALA 0,5 mM alcanzó su pico máximo de 13,1 µg de porfirinas/ 10^{12} UFC y luego disminuyen (Figura IV.13 A). Además, en este punto la cantidad de porfirinas cuantificadas en el medio extracelular es 2,5 veces mayor que las extraídas del contenido intracelular bacteriano. Este comportamiento se observa a concentraciones mayores a ALA 5 mM, donde las porfirinas se mantienen constantes, siendo la cantidad cuantificada en el medio extracelular en promedio 1,7 veces mayor que la cuantificada en el medio intracelular de la célula bacteriana. Sin embargo, es importante destacar que el ALA fue incorporado y se dio lugar a la síntesis de porfirinas en esta bacteria a pesar de que la misma no logró ser fotoinactivada.

Por otro lado, en *P. aeruginosa* también se observó que a una concentración de ALA 0,5 mM se alcanza la máxima cantidad de porfirinas sintetizadas, manteniéndose constante hasta ALA 10 mM (Figura IV.13.B). Cabe destacar que en este caso la cantidad de porfirinas cuantificadas en el medio intracelular es hasta 2 órdenes menos que las cuantificadas en otras cepas bacterianas. Al mismo tiempo, la cantidad de porfirinas cuantificadas en el medio extracelular es en promedio 2,2 veces mayor a la cantidad de porfirinas cuantificadas en el medio intracelular.

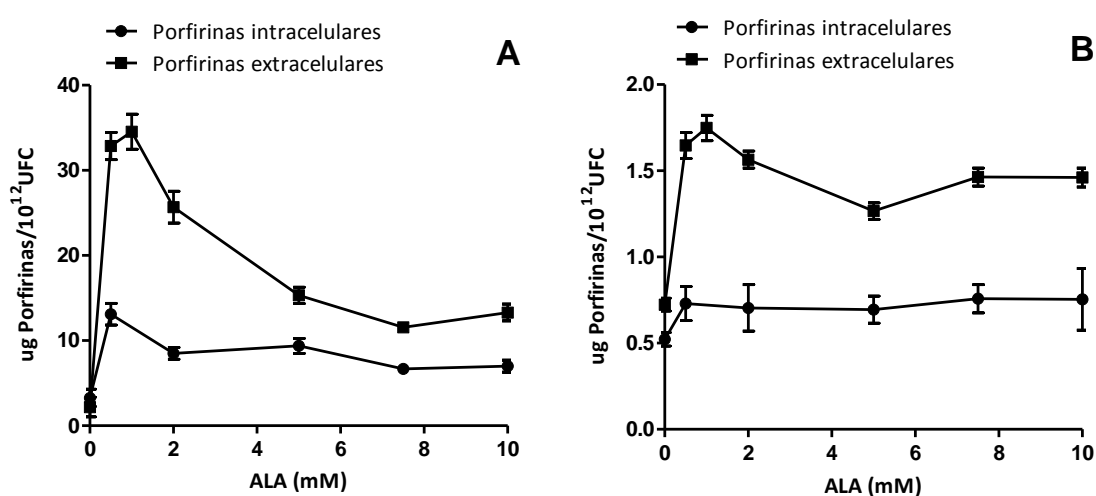


Figura IV.13.: Porphirinas sintetizadas en función de la concentración de ALA en *E.coli* y *P. aeruginosa*.

A) Cultivo planctónico de *E. coli* incubado 4 h con distintas concentraciones de ALA. B) Cultivo planctónico de *P. aeruginosa* incubado 4 h con distintas concentraciones de ALA. (●) Porphirinas intracelulares y (■) porfirinas extracelulares

IV.3.2.1 Perfiles de porfirinas separadas por HPLC en función del tiempo de incubación con ALA en *E. coli*

En las extracciones de porfirinas de cultivos planctónicos de *P. aeruginosa* incubados con ALA 1 mM se obtuvo una cantidad de porfirinas suficiente como para poder ser detectadas mediante esta metodología.

En la cepa de *E. coli* empleada, que mostró una resistencia a la FIB, se pudo cuantificar una elevada cantidad de porfirinas del mismo orden que el de las cepas Gram positivas estudiadas. Es por esto que se decidió realizar perfiles de HPLC en función del tiempo de incubación en esta cepa.

Se incubaron cultivos planctónicos de *E. coli* por 2 h y 4 h con ALA 1 mM, ya que a esta concentración se observó la mayor cantidad de porfirinas sintetizadas (Tabla IV.3). Los perfiles de HPLC de porfirinas intracelulares y extracelulares revelan la ausencia de Uro a las 2 y 4 h de incubación en presencia de ALA. Mientras que a las 2 h, la mayoría de porfirina es Hepta (43%) seguida por Hexa (26%), Penta (15%), Isocopro (9%) y Copro (8%), a las 4 h el perfil se modifica aumentando la proporción de porfirinas más lipofílicas, Copro (81%), Isocopro (11%) y Hexa (8%). Proto no es sintetizada por la cepa de *E. coli* analizada. Con respecto a las porfirinas liberadas al medio, de forma similar al patrón obtenido en bacterias Gram positivas, la porfirina principal es Copro con una contribución menor de Isocopro en ambos tiempos de incubación.

Tabla IV.3: Porcentajes de porfirinas sintetizadas por *E. coli* a partir de ALA determinados por HPLC. Se determinaron las porfirinas intra y extracelulares obtenidas luego de incubar un cultivo planctónico de *E. coli* 2 y 4 h en presencia de ALA 1 mM

Tiempo de incubación		Uro	Hepta	Hexa	Penta	Copro	Isocopro
2 h	Intra		42,7	26,0	15,0	7,7	8,6
	Extra	-	-	-	76,1	23,9	-
4 h	Intra	-	-	7,7	-	81,1	11,2
	Extra	-	-	-	-	79,6	20,4

IV.3.3 Localización de porfirinas por microscopía de fluorescencia en *E. coli*

Habiendo ya demostrado que la cepa de *E. coli* con la que se trabajó no muestra respuesta a la terapia a pesar de incorporar ALA y de sintetizar porfirinas, se observaron dichas bacterias incubadas con ALA, bajo un microscopio de epifluorescencia, dado que si las porfirinas intracelulares se encontraran agregadas, no emitirían fluorescencia.

En las imágenes obtenidas se puede observar el contorno celular con fluorescencia verde correspondiente a EPS y la fluorescencia típica de las porfirinas sintetizadas en todo el citoplasma celular, demostrando de esta forma que esta cepa es capaz de internalizar el ALA y sintetizar porfirinas endógenamente en el citosol. Si bien la resolución de esta microscopía no es lo suficientemente elevada como para afirmarlo, aparentemente no se encuentra fluorescencia roja en la envoltura celular, indicando que no se encuentran ancladas las porfirinas o se encuentran de manera agregada.

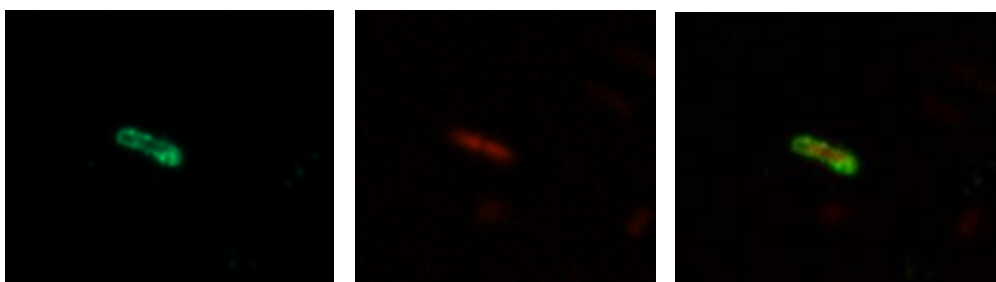


Figura IV. 14: Imagen de porfirinas intracelulares y EPS de *E. coli* por microscopía de fluorescencia.

Imagen de *E.coli* incubada por 4 h con ALA 1 mM, marcada con ConA-FITC y fijada observada por microscopía de epifluorescencia (100X). Magnificada por zoom digital.

IV.4 Discusión

IV.4.1 Eficiencia de fotoinactivación

En este capítulo se llevó a cabo un estudio detallado de la síntesis de porfirinas a partir de incubaciones con ALA en diferentes especies bacterianas *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* y su correlación con la respuesta a la fotoinactivación.

Tanto para *S. epidermidis* como para *S. aureus* se establecieron grados similares de inactivación (reducción de 6-7 y 5 órdenes de magnitud en las UFC/ml para *S. aureus* y para *S. epidermidis*, respectivamente). Cuando se utilizaron dosis de ALA óptimas (1 a 2 mM) se obtuvieron concentraciones de porfirinas similares en ambas bacterias (20 y 45 µg de porfirinas/10¹² UFC para *S. epidermidis* y *S. aureus*, respectivamente) en cultivos planctónicos. Cabe destacar que la cantidad de porfirinas sintetizadas por las biopelículas de ambas especies correspondió a la mitad de la cantidad sintetizada en cultivo planctónico, lo cual se correlaciona con la necesidad de aplicar mayores dosis de luz para alcanzar igual grado de fotoinactivación.

Karrer et al. (1999) demostraron que la ALA-FIB indujo una inhibición significativa del crecimiento de *S. aureus* pero no de *S. epidermidis*. En contraste, Nitzan et al. (2004) observaron que el mismo tratamiento era efectivo contra *S. aureus* y *S. epidermidis* pero no contra las cepas Gram negativas, incluyendo *E. coli* y *P. aeruginosa*. En cambio, estas dos últimas especies pudieron ser fotoinactivadas con éxito por Szocs et al. (1999) y Lee et al. (2004), respectivamente, mediante el tratamiento ALA-FIB, demostrando así que las concentraciones de ALA deben ser optimizadas y adaptadas a las bacterias específicas (Fotinos et al., 2008). Por ende, los trabajos llevados a cabo en condiciones de ALA y luz fijas y no optimizadas para la cepa bacteriana en cuestión (condiciones subóptimas) podrían conducir a resultados engañosos, lo que explicaría las discrepancias en los resultados que se reportan en la literatura. Además, como varios autores abordaron previamente (Maish et al., 2015;

Gandara et al., 2016; Kossakowska et al., 2013), la respuesta a la FIB es altamente dependiente de la cepa tanto en bacterias Gram positivas como negativas. Sin embargo, aún habiendo empleado las variables optimizadas, tales como concentración de ALA, tiempo de incubación con ALA y la dosis de luz, no fue suficiente para erradicar las bacterias Gram positivas. Esto sugiere que existe una limitación intrínseca en la utilización de esta metodología que podría ser mejorada cambiando la fuente de luz (Hsieh et al., 2014; Nitzan et al., 2004).

En cuanto a los resultados obtenidos en las bacterias Gram negativas, las mismas se inactivaron a concentraciones de ALA mucho más altas (40 mM) o bien no pudieron ser inactivadas. En estas especies, la cantidad de porfirinas no se correlacionó con el grado de fotoinactivación. La cepa de *E. coli* estudiada acumuló una concentración de tetrapirroles similar a la observada en los cultivos planctónicos de las bacterias Gram positivas. Del mismo modo, Nitzan et al. (2004) encontraron que la cantidad total de porfirinas producidas en las bacterias Gram negativas era casi dos veces mayor que la cantidad total de porfirinas producidas en los estafilococos, aunque esto no se correlacionó con el grado de fotosensibilización.

En este trabajo de Tesis, *P. aeruginosa* no pudo ser inactivada fotodinámicamente empleando concentraciones de ALA que conducen a la síntesis máxima de porfirinas (1 mM ALA), sin embargo a concentraciones mayores (40 mM) de ALA, donde no se detectaron porfirinas, se alcanzó cierto grado de fotoinactivación (4 órdenes de magnitud en la reducción de UFC/ml). Esto podría deberse a la presencia de porfirinas agregadas no fluorescentes o porfirinógenos que se activan después de la iluminación. Se ha informado que cuando *P. aeruginosa* se expone al ALA, sintetiza predominantemente porfirinógenos fotodinámicamente inactivos y la fotoinactivación del microorganismo es insignificante (Dietel et al., 2007; Bisland et al., 2006; Sailer et al., 1997). Por otro lado, Fotinos et al. (2008) describieron una fuerte correlación entre la eficiencia de la FIB y la cantidad total de porfirinas formadas en *E. coli* K-12 pero no en otras bacterias como *S. aureus* y *P. aeruginosa* debido a los diferentes tipos de

porfirinas producidas, mecanismos de protección (Kim et al., 2002) y localización de porfirinas.

Hasta ahora, el mecanismo principal de las distintas susceptibilidades a la FIB de diferentes cepas de una misma especie bacteriana se ha elucidado completamente (Maish et al., 2015). Sin embargo, son necesarios diferentes parámetros de tiempo de incubación y/o dosis de luz, para lograr una FIB eficiente. Una hipótesis que intenta explicar las diferentes susceptibilidades encontradas entre las distintas especies bacterianas se basa en las diferencias estructurales de la pared celular entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Maish et al., 2015). Con respecto a la ALA-FIB, se ha demostrado que factores tales como la composición de la membrana, los niveles de Proto y otras porfirinas así como también la concentración de ALA empleada contribuyen a la diferente susceptibilidad de las bacterias Gram negativas y Gram positivas (Harris et al., 2012).

En esta investigación se describió que la cantidad de ALA acumulada en *E. coli* correspondió a 2 órdenes de magnitud mayor que la acumulada en las especies Gram positivas estudiadas y 1 orden de magnitud mayor que la observada en *P. aeruginosa*. Esto demuestra que *E. coli* puede acumular ALA en mayor medida que *S. aureus* y *S. apidermidis*, contrariamente a la creencia que su membrana externa es una barrera de permeabilidad bien establecida, y que puede contribuir a niveles más altos de resistencia a ALA-FIB al inhibir la entrada del ALA (Phoenix y Harris, 2006). No obstante, en el caso de la cepa de *E. coli* aquí estudiada, una producción elevada de porfirina no puede fotosensibilizar a esta bacteria. En concordancia con nuestros resultados, otros autores han hipotetizado que las porfirinas presentes en la membrana doble de las bacterias Gram negativas permiten que moléculas pequeñas hidrofílicas ingresen en las bacterias y, por lo tanto, la entrada de ALA no debería ser problemática (Verkamp et al., 1993; Fotinos et al., 2008). Como la internalización de ALA en *E. coli* no es un paso limitante, y la síntesis de porfirina es alta incluso en comparación con bacterias Gram positivas, se supone que la penetración de luz en la estructura interna de la bacteria o la falta de daño eficiente a la membrana externa de

la misma serían los factores responsables de la imposibilidad de erradicar bacterias Gram negativas empleando la fotosensibilización endógena. Además, dado que la FIB que emplea FS que se unen a la superficie externa de las bacterias es también ineficiente (Demidova y Hamblin., 2004; Malik et al., 1992), se cree que el factor limitante podría ser la llegada de la luz al interior bacteriano. Las bacterias Gram negativas no pudieron ser fotoerradicadas totalmente empleando una amplia gama de fuentes de luz, que van desde el azul a la luz roja (Nitzan et al., 2004).

IV.4.2 Porfirinas

Según Dietel et al (2007), el perfil de síntesis de porfirinas de bacterias a partir de ALA depende de muchos parámetros, tales el tiempo de incubación de ALA, concentración de ALA, condiciones de cultivo, fase de crecimiento de las bacterias y valor de pH entre otros factores.

Tanto en *S. aureus* y *S. epidermidis* como en *E. coli* se halló la acumulación intracelular de todas las especies de porfirinas a excepción de Proto, que es la última porfirina del camino metabólico del hemo y la más lipófila. No hay reportes que indiquen que los estafilococos conviertan coproporfinógeno en Proto (Jacobs et al., 1971; de la Fuente et al., 1986; Fotinos et al., 2008; Nitzan et al., 2004) y se ha especulado que algunas especies Gram positivas tienen una ruta alternativa para la síntesis de hemo, sin sintetizar Proto. Sin embargo, hay evidencias sobre la presencia de Proto en la metabolización del hemo en bacterias Gram negativas, aunque en algunas especies como *Porphyromonas gingivalis*, no acumulan Proto luego de la incubación con ALA (Soukos y Goodson, 2011).

Tanto en *S. aureus* como en *S. epidermidis*, a mayor tiempo de incubación con el ALA se incrementan las porfirinas más hidrofílicas y las más lipofílicas disminuyen. En línea con los resultados de esta Tesis, Dietel et al. (2007) encontraron que no sólo las diferentes especies bacterianas producen diferentes porfirinas

fluorescentes, sino que una cepa en particular puede también inducir la formación de diferentes porfirinas fluorescentes en función del tiempo de incubación con ALA. En general, a tiempos más largos de incubación se encuentra favorecida la formación de porfirinas solubles en agua. Por otro lado, en cuanto a la síntesis de porfirinas en función de la concentración de ALA, no se observó un patrón coincidente de cambio de porfirina en las especies analizadas.

En *E. coli*, hay una tendencia a acumular intracelularmente una cantidad importante de porfirinas lipófilas. Mientras que Uro no está presente en absoluto, el resto de las porfirinas están presentes en una concentración variable dependiendo del tiempo de exposición al ALA, con una tendencia a acumular las más lipofílicas, también en periodos de incubación más largos. Fotinos et al. (2008) especularon que en ciertas cepas de *E. coli*, cuando se sintetizan pequeñas cantidades de porfirinas, las enzimas de la ruta del hemo pueden descarboxilar una alta proporción de porfirinas conduciendo a la acumulación de las principalmente lipofílicas. Cuando se producen cantidades elevadas de porfirinas puede verse sobrepasado el camino biosintético del hemo, lo que conduce a una mayor producción de porfirinas hidrófilas, que son las primeras en dicho camino metabólico.

También, Nitzan et al (2004) atribuyeron las diferencias en la tasa de fotoinactivación encontradas entre diferentes cepas de estafilococos a la distribución y tipo de porfirina, siendo Copro la porfirina predominante. En las bacterias Gram negativas, no hubo un tipo de porfirina predominante ya que las porfirinas encontradas fueron en su mayoría Penta, Uro, Hepta, Copro y Proto. Aunque la producción total de porfirinas en las bacterias Gram negativas fue mayor que en los estafilococos, la cantidad de Copro producida por estas últimas fue dos o tres veces mayor que en las bacterias Gram negativas. Por cierto, el trabajo de Nitzan et al. (2004) describe que los estafilococos sufrieron el mayor daño celular luego de la FIB con ALA. Los autores sugirieron que la causa para el alto nivel de fotoinactivación en los estafilococos es aparentemente la presencia de altas cantidades de coproporfirina. Al mismo tiempo trabajos de Szocs et al. (1999) indicarían, mediante estudios de

espectroscopía del tipo “fluorescence line narrowing” de una cepa de *E. coli*, que la mayoría de las porfirinas existen en un estado agregado, mientras que sólo una pequeña población de porfirinas se encuentra en el estado monomérico, el cual puede ser FS. En las especies estafilocócicas en las que la porfirina predominante es la coproporfirina, el estado monomérico puede ser alto y la cantidad disponible para la fotoinactivación puede ser suficiente para la erradicación de toda la población bacteriana (Szocs et al., 1999).

En este trabajo de Tesis se encontraron dos picos de porfirinas ubicados entre los estándares de Copro y Proto. Estos picos coinciden con los descritos por Jackson et al. (1982), y corresponden a isocoproporfirina + de-etilisocoproporfirina tetrametil éster y picos de deshidroisocoproporfirina. El hallazgo aquí obtenido de un tetrapirrol de la serie de isocoproporfirinas sería por primera vez reportado en bacterias. Las porfirinas de la serie de isocoproporfirinas son componentes prominentes de los patrones complejos de sobreproducción de porfirina que caracterizan a la porfiria cutánea tardía. Elder (1972) postuló que la dehidroisocoproporfirina, o el correspondiente porfirinógeno, se sintetiza en el hígado, se excreta en la bilis y se convierte por microorganismos intestinales en iso y de etilisocoproporfirinas. Dicho autor formuló la hipótesis de que estas porfirinas se formaron por reducción, desvinilación e hidratación, respectivamente, de la dehidroisocoproporfirina. La dehidroisocoproporfirina se forma a partir del porfirinógeno correspondiente, que a su vez surge por acción de la enzima copropogenasa sobre el precursor de porfirinógeno pentacarboxílico normal del coproporfirinógeno III.

Además se encontró una liberación selectiva de Copro al medio de cultivo, independientemente del tipo de porfirina acumulada intracelularmente. Vale la pena señalar que existe un eflujo selectivo de Copro que es una porfirina lipofílica, y este hecho se observa tanto en las bacterias Gram positivas como Gram negativas, lo que demuestra que las diferencias en las envolturas bacterianas entre ambos grupos no afecta el tipo de porfirina liberada. De manera similar, Nitzan et al. (1999) demostró

que la principal porfirina intracelular de las bacterias era Uro, mientras que la porfirina excretada era principalmente Copro: 57.2% por *E. coli* y 95% por *S. aureus*.

En cuanto a la comparación entre los diferentes modos de vida (sésil o vida libre) de *S. epidermidis*, la proporción de porfirinas liberadas fue 1,7 veces mayor en biopelículas en comparación con los cultivos planctónicos en donde las porfirinas intra- y extracelulares fueron semejantes. En el caso de *S. aureus* se observó que en cultivo planctónico la cantidad de porfirinas extracelulares fue menor que la intracelular. Sin embargo, en biopelículas de *S. aureus* se mantuvieron valores semejantes de porfirinas hasta ALA 3 mM. A concentraciones mayores de ALA la cantidad de porfirinas extracelulares fue dos veces mayor que la intracelular. Esto puede deberse probablemente a un grado de atrapamiento de porfirinas dentro del EPS de la biopelícula. Por otra parte, la bacteria Gram negativa *E. coli* en estado planctónico liberó al medio extracelular más cantidad de porfirinas que las Gram positivas.

En todas las especies bacterianas estudiadas se observó un pico de síntesis de porfirinas en ambos estados de crecimiento (planctónico y biopelícula) cuando se utilizaron concentraciones de ALA 1-2 mM, destacándose que en las biopelículas los picos son más pronunciados que los respectivos cultivos planctónicos. En general, estos picos se correlacionan con la máxima respuesta a la FIB observada. Fotinos et al (2008) hallaron un perfil en forma de campana al graficar las porfirinas en función de la concentración de ALA para la cepa *E. coli* K-12, y la disminución de UFC/ml se correlacionó con el aumento de porfirinas a bajas concentraciones de ALA. Por otro lado, el aumento de las porfirinas totales en función del tiempo de incubación y del número de UFC no correlacionaría según los resultados hallados en el presente trabajo. Una meseta en la muerte de las células bacterianas se alcanza al cabo de cierto tiempo de incubación con ALA. La acumulación de una mayor proporción de tetrapirroles hidrofílicos a tiempos de incubación más largos sugiere que estas especies de porfirina son menos fotoactivas.

Las diferentes eficiencias de fotosensibilización de las porfirinas hidrofílicas y lipofílicas han sido reportadas en células eucariotas pero no en bacterias. Al respecto, en células endoteliales se observó un aumento gradual de la eficacia fotodinámica en este orden: Uro<Copro<Proto (Strauss et al., 1997). Asimismo, se han informado rendimientos cuánticos de oxígeno singlete para porfirinas de origen natural de diferente lipofilicidad en solución acuosa (Uro, 0,52; Copro, 0,28; Hematoporfirina 0,53) (Lambert et al., 1986). Por lo tanto, los rendimientos cuánticos de oxígeno singlete difícilmente pueden explicar la eficacia fotodinámica de las porfirinas naturales, pero hasta la fecha no hay informes de la porfirina fotoactiva más eficaz en bacterias.

IV.5 Conclusiones

Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento de FIB empleando el pro-FS ALA efectuado sobre cultivos planctónicos y biopelículas de bacterias Gram positivas es efectivo. Se comprobó que el ALA es un precursor de porfirinas fotosensibilizantes que permite la fotoinactivación de las bacterias que las sintetizan, sin provocar toxicidad en oscuridad. Además se comprobó que el tipo y cantidad total de porfirinas es especie-dependiente. En el tratamiento de FIB aplicado a *P. aeruginosa* se necesitó elevar las concentraciones de ALA y aumentar los tiempos de incubación, debido a la dificultad que presentó esta especie para ser fotosensibilizada. En el caso de *E. coli* no pudo lograrse la fotoinactivación bajo ninguna de las condiciones estudiadas.

Por otro lado, los tipos de porfirinas sintetizadas son una variable clave para lograr una fotoinactivación exitosa empleando ALA. La síntesis de las porfirinas fue dependiente de la concentración de ALA, del tiempo de incubación y de la bacteria a tratar. Por lo cual, se concluye que para cada tratamiento de fotoinactivación bacteriana es necesario optimizar estas variables, con el fin de exacerbar la síntesis de las porfirinas y poder producir así un mayor efecto fotosensibilizante mediante el incremento de la cantidad total de las mismas.

Conclusiones finales

En este trabajo se propone el uso de la FIB como una posible terapia alternativa al empleo de antibióticos y efectiva contra infecciones bacterianas superficiales o de acceso por vía endoscópica mediante el uso de FS tales como TAPP o precursores de los mismos tales como el ALA.

Al evaluar la respuesta a la FIB-TAPP de *S. aureus* y *P. aeruginosa* en cultivos planctónicos se obtuvieron resultados que demuestran que mayores concentraciones de TAPP son requeridas para fotoinactivar *P. aeruginosa* en comparación aquellas utilizadas para *S. aureus*. Por otro lado, la fotoinactivación de las biopelículas formadas por *S. aureus* o *P. aeruginosa* requirió concentraciones de TAPP y dosis lumínicas mayores a las utilizadas para cultivos planctónicos, obteniéndose resultados similares para ambas especies.

En conclusión, la FIB empleando la porfirina sintética TAPP fue efectiva en la erradicación de *S. aureus* en crecimiento planctónico y en la eliminación parcial de su biopelícula crecida sobre poliestireno. Por cierto, las especies Gram positivas estudiadas respondieron a este tratamiento con una eficiencia incrementada respecto a la observada en los patógenos Gram negativos.

Además, las biopelículas de *E. faecalis* formadas sobre superficies de titanio pudieron ser fotoinactivadas por el tratamiento de FIB-TAPP, y el pre-tratamiento fototérmico con láser infrarrojo es aditivo al efecto de la FIB sobre ellas. Estos resultados revisten importancia clínica en el tratamiento de prótesis dentales infectadas por *Enterococcus* spp. a las cuales se puede acceder con la luz por medio de fibras ópticas, y como terapia adicional durante el proceso de “toilette quirúrgica” mediante iluminación de la zona infectada previa administración de un FS apropiado.

También se demostró la eficacia que tiene el tratamiento de FIB utilizando ALA -compuesto aprobado por la FDA para su uso antitumoral- en cultivos planctónicos y en biopelículas de patógenos Gram positivos y negativos. Es de destacar que para el tratamiento de ALA-FIB, la eficiencia de fotosensibilización fue similar para todas las

especies estudiadas tanto en crecimiento planctónico como en biopelículas, demostrando que la molécula de ALA no presentaría mayores inconvenientes para penetrar las diversas matrices extracelulares de las biopelículas formadas por Gram negativas o Gram positivas.

Tras la incubación con el precursor ALA, la cantidad de porfirinas totales y el tipo de porfirina sintetizada por tres de las especies bacterianas estudiadas es variable y están directamente relacionadas con la respuesta a la terapia. Además, la proporción de cada tipo de porfirina acumulada intracelularmente varía en forma cepa-dependiente, como así también con las condiciones de concentración de ALA y tiempos de incubación con este precursor.

En cuanto a la excreción de porfirinas, se observó que Coproporfirina se encuentra presente en forma mayoritaria en el medio extracelular de todas las especies analizadas, por lo cual, teniendo en cuenta que los patrones de porfirinas intracelulares son totalmente diferentes entre las distintas especies bacterianas, se infiere que las bacterias tienen un control finamente regulado tanto sobre la síntesis de porfirinas como sobre su liberación diferencial al medio.

En las biopelículas de *S. epidermidis* las porfirinas se localizan en todo el citoplasma celular y aparentemente en su envoltura, mientras que no se encuentra una cantidad significativa de porfirinas en la matriz extracelular.

Las células bacterianas de *P. aeruginosa* y *E. coli* son relativamente refractarias al tratamiento fotoinactivante tanto para los FS que actúan desde el exterior como para los generados endógenamente en las bacterias como es el caso de las porfirinas sintetizadas a partir de ALA. La observación de elevada cantidad de porfirinas endógenas acumuladas en *E. coli* resistente a la FIB cuestiona el paradigma de que la ausencia de respuesta a la FIB por las bacterias Gram negativas es debido a la escasa incorporación de FS por estas células.

En conjunto, la FIB puede ser un tratamiento efectivo y alternativo al empleo de antibióticos para el control y eliminación de infecciones por bacterias Gram negativas y positivas, tanto en estado planctónico como en biopelículas.

INDICE

Agradecimientos.....	2
Resumen.....	4
Abreviaturas.....	7
Introducción.....	8
I. Bacterias.....	9
I.1 Generalidades.....	9
I.1.1 Biopelículas.....	10
I.2 Bacterias Gram negativas.....	15
I.2.1 <i>Escherichia coli</i> : Características generales.....	15
I.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : Características generales.....	16
I.3 Bacterias Gram positivas.....	17
I.3.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i> : Características generales.....	17
I.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i> : Características generales.....	18
I.3.3 <i>Enterococcus faecalis</i> : Características generales.....	20
II. Implantes odontológicos e infecciones bucales.....	20
II.1 Implantes odontológicos.....	20
II.2 Infecciones bucales.....	24
III. Terapia Fotodinámica.....	26
III.1 Generalidades.....	26
III.2 Fotoinactivación bacteriana.....	27
III.2.1 Mecanismos de daño por FIB.....	31
III.2.2 Fotosensibilizantes.....	34
III.3 Búsqueda de nuevos FS.....	37
III.3.1 Las porfirinas como FS.....	39
III.3.1.1 Fotoquímica de las Porphirinas.....	40
III.3.1.2 Porphirinas sintéticas: TAPP.....	41
III.3.1.3 ALA como precursor de porfirinas.....	42
III.4 Fuentes de luz.....	44
IV. Inactivación fototérmica.....	47

Objetivos.....	48
Materiales y métodos	
I. Reactivos.....	50
II. Placas de Titanio.....	50
III. Bacterias, medios y condiciones de cultivo.....	52
IV. Cultivo planctónico.....	53
V. Formación de biopelículas.....	53
VI. Fotoinactivación bacteriana.....	53
VII. Fuente de luz para FIB.....	54
VIII. Terapia fototérmica (láser 980 nm).....	54
IX. Ensayo de unión/captación de TAPP por <i>S. aureus</i>	55
X. Extracción de porfirinas.....	56
XI. Cuantificación de porfirinas a partir de ALA y espectros de fluorescencia.....	56
XII. Cromatografía líquida de alta precisión fase reversa (RP-HPLC).....	56
XIII. Cuantificación de ALA acumulado intracelularmente.....	57
XIV. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	58
XV. Microscopía Confocal de fluorescencia	
XV. 1 Determinación de viabilidad en biopelículas bacterianas.....	59
XV.2 Análisis de porfirinas y componentes de las biopelículas bacterianas.....	60
XVI. Microscopía de epifluorescencia.....	61
XVII. Análisis estadístico.....	61
Resultados	
I. Inactivación fotodinámica de cultivos planctónicos y biopelículas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> empleando una porfirina sintética.....	63
I.1 FIB empleando TAPP en cultivos planctónicos de <i>S. aureus</i>	64
I.2 FIB empleando TAPP en biopelículas de <i>S. aureus</i>	65
I.3 Captación/unión de TAPP a <i>S. aureus</i> creciendo en estado planctónico y en biopelículas.....	67
I.4 TAPP-FIB de <i>P. aeruginosa</i> creciendo en estado planctónico y en biopelículas.....	69
I.5 Microscopía de biopelículas de <i>S. aureus</i> tratados con TAPP-FIB.....	70

I.6	Discusión.....	72
I.7	Conclusiones.....	77
II.	Fotoinactivación de biopelículas bacterianas en superficies de titanio empleando TAPP y tratamiento fototérmico con láser de 980 nm.	
II.1	Caracterización de las placas de titanio	
II.1.1	Microscopía electrónica de barrido de las placas de titanio.....	79
II.1.2	Formación de biopelículas sobre placas de titanio con distintos tratamientos.....	79
II.2	TAPP-FIB en biopelículas de <i>E. faecalis</i>	
II.2.1	TAPP-FIB en biopelículas de <i>E. faecalis</i> crecidas sobre placas de poliestireno.....	82
II.2.2	TAPP-FIB en biopelículas de <i>E. faecalis</i> crecidas sobre placas de titanio.....	84
II.3	Caracterización del tratamiento fototérmico	
II.3.1	Efecto fototérmico de la irradiación con láser de 980 nm.....	85
II.3.2	Efecto del láser de 980 nm sobre biopelículas de <i>E. faecalis</i> formadas sobre titanio (terapia fototérmica).....	85
II.4	Tratamiento fototérmico en combinación con TAPP-FIB en biopelículas de <i>E. faecalis</i> adheridas a placas de titanio.....	87
II.4.1	Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia para documentar la viabilidad bacteriana de biopelículas de <i>E. faecalis</i> adheridas a placas de titanio y tratadas con TAPP-FIB y terapia fototérmica.....	88
II.5	Pre-tratamiento fototérmico y TAPP-FIB de biopelículas de <i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i> sobre placas de titanio.....	91
II.6	Discusión.....	91
II.7	Conclusiones.....	97
II.	Puesta a punto del sistema empleado en ALA-FIB.	
III.1	Puesta a punto del sistema de irradiación empleado en ALA-FIB.....	100
III.1.1	Tubos fluorescentes.....	100
III.1.2	Sistema de irradiación de tubos fluorescentes vs focos halógenos.....	101
III.1.3	Sistema de focos halógenos vs láser 630 nm.....	103

III.2 Puesta a punto del medio de incubación e irradiación empleado	
III.2.1 Medio empleado durante la irradiación.....	104
III.2.2 Medio de incubación con ALA.....	106
III.3 Puesta a punto de la determinación de porfirinas acumuladas en bacteria.....	107
III. 4 Condiciones de cultivo de biopelículas.....	109
III.5 Discusión.....	110
III.6 Conclusiones.....	113
IV. Fotoinactivación de cultivos planctónicos y biopelículas bacterianas empleando ácido 5-aminolevulínico.	
IV.1 Fotoinactivación bacteriana de cultivos planctónicos de bacterias Gram positivas <i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>	115
IV.1.1 Influencia de la concentración de ALA en la fotoinactivación de cultivos planctónicos de bacterias Gram positivas.....	115
IV.1.1.1 Perfiles de porfirinas determinados por HPLC en función de la concentración de ALA en bacterias Gram positivas.....	116
IV.1.2 Influencia de los tiempos de incubación con ALA en la fotoinactivación de cultivos planctónicos de bacterias Gram positivas.....	118
IV.1.2.1 Perfiles de porfirinas determinadas por HPLC en función del tiempo de incubación con ALA en bacterias Gram positivas.....	119
IV.1.2.2 Cuantificación de ALA incorporado en las cepas Gram positivas.....	120
IV.1.3 La influencia de la dosis lumínica en la ALA-FIB de cultivos planctónicos de bacterias Gram positivas.....	121
IV.2 Fotoinactivación bacteriana de biopelículas de bacterias Gram positivas.....	122
IV.2.1 Influencia de la concentración de ALA en la fotoinactivación de biopelículas de bacterias Gram positivas.....	122
IV.2.2 Influencia del tiempo de incubación con ALA en la fotoinactivación de biopelículas de bacterias Gram positivas.....	124

IV.2.3 Influencia de la dosis lumínica en la fotoinactivación de biopelículas bacterianas Gram positivas empleando ALA.....	125
IV.2.4 Análisis de porfirinas y componentes de las biopelículas de bacterias Gram positivas por microscopía de fluorescencia.....	126
IV.2.4.1 FITC y Concanavalina A en biopelículas de <i>S. epidermidis</i>	126
IV.2.4.2 CLSM de fluorescencia de biopelículas de <i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i> tratadas con ALA-FIB.....	128
IV.3 Fotoinactivación bacteriana de cultivos planctónicos de bacterias Gram negativas <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i>	132
IV.3.1 Influencia de la concentración de ALA en la fotoinactivación de cultivos planctónicos de bacterias Gram negativas.....	132
IV.3.1.1 Cuantificación de ALA incorporado en bacterias Gram negativas.....	133
IV.3.2 Porphirinas sintetizadas en cultivos planctónicos de bacterias Gram negativas.....	133
IV.3.2.1 Perfiles de porfirinas separadas por HPLC en función del tiempo de incubación con ALA en <i>E. coli</i>	134
IV.3.3 Localización de porfirinas por microscopía de fluorescencia en <i>E. coli</i>	136
IV.4 Discusión	
IV.4.1 Eficiencia de fotoinactivación.....	137
IV.4.2 Porphirinas.....	140
IV.5 Conclusiones.....	144
Conclusión Final.....	146

Referencias

1. Abrahamse H and Hamblin M. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem. J.* (2016) 473, 347–364.
2. Agarwal A and Jain A. Glucose & sodium chloride induced biofilm production & ica operon in clinical isolates of staphylococci. *Indian J Med Res.* 2013 Aug; 138(2): 262–266.
3. Aguayo, S., Donos, N., Spratt, D., y Bozec, L. Nanoadhesion of *Staphylococcus aureus* onto titanium implant surfaces. *Journal of dental research.* 2015, 94(8), 1078-1084.
4. Alekshun MN, Levy SB. The mar regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol.* 1999, 7:410-413.
5. Alhashem F, Tiren-Verbeet NL, Alp E1, Doganay M. Treatment of sepsis: What is the antibiotic choice in bacteremia due to carbapenem resistant Enterobacteriaceae? *World J Clin Cases.* 2017 Aug 16;5(8):324-332.
6. Alvarez AF, Malpica R, Contreras M, Escamilla E, Georgellis D. Cytochrome d but not cytochrome o rescues the toluidine blue growth sensitivity of arc mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2010, 192(2):391-399.
7. Alves E, Costa L, Carvalho CM, Tomé JM, Faustino MA, Neves MG, Tomé AC, Cavaleiro JA, Cunha A, Almeida A. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Grampositive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol.* 2010, 15:70.
8. Alves E, Faustino MA, Neves MG, Cunha Â, Nadais H, Almeida A. Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope. *J Photochem Photobiol C.* 2015, 22:34-57
9. Appelbaum PC. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2006, 12 (Suppl 1):16-23.
10. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms Properties, regulation and roles in human disease. *Virulence.* 2011, 2(5): 445-459.
11. Arias CA, Contreras GA, Murray BE. Management of multi-drug resistant enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2010, 16:555–562.

12. Arias, M. P. C., Maliza, A. G. A., Midená, R. Z., Graeff, M. S. Z., Duarte, M. A. H., y Andrade, F. B. D. Effect of ultrasonic streaming on intra-dental disinfection and penetration of calcium hydroxide paste in endodontic treatment. *Journal of Applied Oral Science*. 2016, 24(6), 575-581.
13. Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: Beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2012, 10:266–278.
14. Aspiroz C, Sevil M, Toyas C, Gilaberte Y. Photodynamic Therapy With Methylene Blue for Skin Ulcers Infected With *Pseudomonas aeruginosa* and *Fusarium* spp. *Actas Dermosifiliogr*. 2017 Jul - Aug;108(6):e45-e48.
15. Aswathanarayan JB and Vittal RR. Attachment and Biofilm Formation of *Pseudomonas fluorescens* PSD4 Isolated from a Dairy Processing Line. *Food Sci. Biotechnol*. 2014, 23(6): 1903-1910.
16. Ballatore MB, Spesia MB, Milanesio ME, Durantini EN. Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of porphyrine fullerene C60 dyads with application in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Med Chem*. 2014, 83:685-694.
17. Banfi S, Caruso S, Buccafurni L, Battini V, Zazzaron S, Barbieri P, Orlandi V. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: an in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria. *J Photochem Photobiol B*. 2006, 85:28-38.
18. Barra F, Roscetto E, Soriano AA, Vollaro A, Postiglione I, Pierantoni GM, Palumbo G, Catania MR. Photodynamic and Antibiotic Therapy in Combination to Fight Biofilms and Resistant Surface Bacterial Infections. *Int J Mol Sci*. 2015, 16(9): 20417–20430.
19. Bayer MG, Heinrichs JH, Cheung AL. The molecular architecture of the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1996, 178: 4563-4570.
20. Beirão S, Fernandes S, Coelho J, Faustino MA, Tomé JP, Neves MG, Tomé AC, Almeida A, Cunha A. Photodynamic inactivation of bacterial and yeast biofilms with a cationic porphyrin, *Photochem Photobiol*. 2014, 90:1387-1396.
21. Bhatti M, Nair SP, MacRobert AJ, Henderson B, Shepherd P, Cridland J, Wilson M. Identification of photolabile outer membrane proteins of *Porphyromonas gingivalis*. *Curr Microbiol*. 2001, 43(2):96-99

22. Biel MA, Sievert C, Usacheva M, Teichert M, Balcom J. Antimicrobial photodynamic therapy treatment of chronic recurrent sinusitis biofilms. *Int. Forum Allergy Rhinol.* 2011, 1(5): 329–334.
23. Bisland SK, Chien C, Wilson BC, Burch S. Pre-clinical in vitro and in vivo studies to examine the potential use of photodynamic therapy in the treatment of osteomyelitis. *Photochem Photobiol Sci* 2006, 5:31—8.
24. Bisland SK, Dadani FN, Chien C, Wilson BC. Hyperbaric oxygen therapy augments the photodynamic action of methylene blue against bacteria in vitro—art. no. 64270F. Optical methods for tumor treatment and detection: Mechanisms and techniques in photodynamic therapy XVI, Proceedings of SPIE, vol. 6427, 2007. F4270–F4270
25. Blázquez-Castro A, Stockert JC, Sanz-Rodríguez F, Zamarrón A, Juarranz A. Differential photodynamic response of cultured cells to methylene blue and toluidine blue: role of dark redox processes. *Photochem Photobiol Sci.* 2009, 8(3):371-376.
26. Boles BR, Horswill AR. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.* 2008, 4:e1000052.
27. Braga FC, Serra CP, Viana NS Jr, Oliveira AB, Côrtes SF, Lombardi JÁ. Angiotensin-converting enzyme inhibition by Brazilian plants. *Fitoterapia.* 2007, 78: 353-358.
28. Brancalion L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2002, 17(3):173-186.
29. Briceño Castellanos, J. F., Gaviria Beitia, D. A., y Carranza Rodríguez, Y. A. Láser en odontología: fundamentos físicos y biológicos. *Universitas Odontológica*, 2016, 35(75).
30. Bronner S, Monteil H, Prevost G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev.* 2004, 28:183-200.
31. Brook I. Beta-lactamase-producing bacteria in mixed infections. *Clin Microbiol Infect.* 2004 Sep;10(9):777-84..
32. Bruce-Micah R, Hüttenberger D, Freitag L, Cullum J, Foth HJ. Pharmacokinetic of ALA and h-ALA induced porphyrins in the models *Mycobacterium phlei* and *Mycobacterium smegmatis*. *J Photochem Photobiol B.* 2009, 6;97(1):1-7

33. Brumfitt W, Hamilton-Miller J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med*. 1989, 320:1188-1196.
34. Bürgers, R., Gerlach, T., Hahnel, S. , Schwarz, F., Handel, G. y Gosau, M. In vivo and in vitro biopelículas formation on two different titanium implant surfaces. *Clin. Oral Impl. Res.* , 2010, 21: 156-164
35. Caminos DA, Durantini EN. Synthesis of asymmetrically meso-substituted porphyrins bearing amino groups as potential cationic photodynamic agents. *J Porphyrin Phthalocyanine*. 2005, 9: 334-342
36. Caprioglio, C., Olivi, G., y Genovese, M. D. Lasers in dental traumatology. Ed. Martina Bologna 2010.
37. Carrizo, N., de San Jose, A., Pazos, L. y Parodi, B. Colored nanostructure CaP-based coating for implant application. 2014
38. Caruso E, Ferrara S, Ferruti P, Manfredi A, Ranucci E, Orlandi VT. Enhanced photoinduced antibacterial activity of a BODIPY photosensitizer in the presence of polyamidoamines. *Lasers Med Sci*. 2017.
39. Cebrián G, Condón S, Mañas P. Heat-adaptation induced thermotolerance in *Staphylococcus aureus*: Influence of the alternative factor sigmaB. *Int J Food Microbiol*. 2009, 135(3):274-280.
40. Chen WR, Adams RL, Bartels KE, Nordquist RE. Chromophore-enhanced in vivo tumor cell destruction using an 808-nm diode laser. *Cancer Lett*. 1995, 94(2):125-131.
41. Chien YT, Manna AC, Projan SJ, Cheung AL. SarA, a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for sar-dependent gene regulation. *J Biol Chem*. 1999, 274:37169-37176.
42. Cho, K., Lee, Y., Chang, B., Um, H. y Lee, J. The effect of photodynamic therapy on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* attached to surface-modified titanium. *J Periodontal Implant Sci*, 2015, 45(2): 38-44.
43. Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol*. 2014, 12:405
44. Corrigan RM, Rigby D, Handley P, Foster TJ. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology*. 2007,153:2435-2446.

45. Costerton J, Stewart P, Greenberg E. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999, 284:1318-1322.
46. Conterno, G. y Pazos, L. Ingeniería de superficies en implantes dentales. Reporte metalmecánico, 2003, 3(4): 4-5.
47. Conterno, G., Pazos, L., Egidi, D. A., Corengia, P., De Rosa, H. y Crosta, R. Tratamientos de superficie en biomateriales: efectos del blasting sobre implantes dentales de titanio. 5º Jornadas de desarrollo e innovación tecnológica. 1-2. 2004.
48. Corengia, P. A., Conterno, G., Pazos, L., Egidi, D. A., Menéndez, D., DeRosa, H. y Crosta, R. Influencia del blasting con Al₂O₃ y vidrio en las características de superficie de implantes dentales. 2003.
49. Cox R, Charles HP. Porphyrin-accumulating mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1973 Jan;113(1):122-32.
50. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun*. 1999, 67:5427-5433.
51. Crowcroft NS, Ronveaux O, Monnet DL, Mertens R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and antimicrobial use in Belgian hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1999, 20:31-36.
52. Dai T, Huang Y-Y, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections—State of the art. *Photodiagn Photodyn Ther* 2009;6:170–188.
53. Dailey HA, Dailey TA, Gerdes S, Jahn D, Jahn M, O'Brian MR, Warren MJ. Prokaryotic Heme Biosynthesis: Multiple Pathways to a Common Essential Product. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2017 Jan 25;81(1). pii: e00048-16
54. Dale, J. L., Nilson, J. L., Barnes, A. M., y Dunny, G. M. Restructuring of *Enterococcus faecalis* biopelícula architecture in response to antibiotic-induced stress. *NPJ Biopelículas and Microbiomes*, 3. 2017.
55. Daniel H, Spanier B, Kottra G, Weitz D. From bacteria to man: Archaic proton-dependent peptide transporters at work. *Physiology* 2006;21:93–102.

56. Darabpour E, Kashef N, Mashayekhan S. Chitosan nanoparticles enhance the efficiency of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation of bacterial biofilms: An in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016 Jun;14:211-7.
57. Davies A, Gebremedhin S, Yee M, Padilla RJ, Duzgunes N, Konopka K, Dorocka-Bobkowska B. Cationic porphyrin-mediated photodynamic inactivation of *Candida* biofilms and the effect of miconazole. *J Physiol Pharmacol*. 2016 Oct;67(5):777-783.
58. De Matteis, F. and Lim, C.K., Porphyrins as Non-Destructive Indicators of Exposure to Environmental Pollutants. In: *Non-destructive Biomarkers in Vertebrates*, Fossi, C and Leonzio, C. (eds), Lewis Publisher, Boca Raton, USA, 1994, pp.93-128.
59. de Melo WC, Avci P, de Oliveira MN, Gupta A, Vecchio D, Sadasivam M, Chandran R, Huang YY, Yin R, Perussi LR, Tegosi GP, Perussi JR, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013, 11(7):669-693.
60. Demidova T, Hamblin M. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2004, 17:245-254.
61. Demidova T, Hamblin N. Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005, 49: 2329-2335.
62. Di Poto A, Sbarra MS, Provenza G, Visai L, Speziale P. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biomaterials*. 2009;30:3158-3166.
63. Diaz, C. Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas). 2011.
64. Dietel W, Bolsen K, Dickson E, Fritsch C, Pottier R, Wendenburg R. Formation of water-soluble porphyrins and protoporphyrin IX in 5-aminolevulinic-acid-incubated carcinoma cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 33, 1996, 225-231.
65. Dietel W, Pottier R, Pfister W, Schleler P, Zinner K. 5-Aminolaevulinic acid (ALA) induced formation of different fluorescent porphyrins: A study of the biosynthesis of porphyrins by bacteria of the human digestive tract. *J Photochem Photobiol B* 2007;86:77-86.

66. Donlan, R. M. Biopelículas and device-associated infections. *Emerging infectious Diseases*, 2001, 7(2): 277-281.
67. Donlan, R. M. Biopelículas: Microbial life on surfaces. *Emerging infectious Diseases*, 2001, 8(9): 881-885.
68. Döpke W, Mola IL, Hess U. Alkaloid and steroid sapogenin content of *Solanum verbascifolium*. *Pharmazie*. 1976, 31: 656.
69. Doss M., Schmidt A. Rapid Determination of Urinary Total Porphyrins by Ion Exchange Chromatography. *Z. klin. Chem, u. klin. Biochem*. 1971, 9: 415-418.
70. Doss M, Sixel-Dietrich F, Verspohl F. "Glucose Effect" and Rate Limiting Function of Uroporphyrinogen Synthase on Porphyrin Metabolism in Hepatocyte Culture: Relationship with Human Acute Hepatic Porphyrrias. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem*. Vol. 23, 1985, pp. 505-513
71. Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, Brown EL, Zagursky RJ, Shlaes D, Projan SJ. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* gene regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J. Bacteriol*. 2011, 183:7341-7353.
72. Dziekan G, Hahn A, Thune K, Schwarzer G, Schafer K, Daschner FD, Grundmann H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a teaching hospital: investigation of nosocomial transmission using a matched case-control study. *J Hosp Infect*. 2000, 46:263-270.
73. Ebermann R, Alth G, Kreitner M, Kubin A. Natural products derived from plants as potential drugs for the photodynamic destruction of tumor cells. *J Photochem Photobiol B*. 1996, 36:95-97.
74. Elder GH. Identification of a group of tetracarboxylate porphyrins, containing one acetate and three propionate -substituents, in faeces from patients with symptomatic cutaneous hepatic porphyria and from rats with porphyria due to hexachlorobenzene. *Biochem J*. 1972, 126(4):877-891.
75. Evans, M., Davies, J. K., Sundqvist, G., y Figdor, D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *International Endodontic Journal*, 2002, 35(3), 221-228.
76. Fiel RJ, Datta-Gupta N, Mark EH, Howard JC. Induction of DNA damage by porphyrin photosensitizers, *Cancer Res*. 1981, 41:3543–3545.

77. Flanagan, D. Enterococcus faecalis and Dental Implants. *Journal of Oral Implantology*, 2017, 43(1), 8-11.
78. Fotinos N, Convert M, Piffaretti JC, Gurny R, Lange N. Effects on gram-negative and gram-positive bacteria mediated by 5-aminolevulinic Acid and 5-aminolevulinic acid derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Apr;52(4):1366-73.
79. Foster TJ, Hook M. Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus. *Trends Microbiol*. 1998, 6:484-488.
80. Fröjd, V., Chávez de Paz, L., Andersson, M., Wennerberg, A., Davies, J. R. y Svensäter, G. In situ analysis of multispecies biopelícula formation on customized titanium surfaces. *Molecular Oral Microbiology*, 2011, 26: 241-252.
81. Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004, 48:2173-2178.
82. Gándara, L. Fotoinactivación de Staphylococcus aureus en crecimiento planctónico y en biopelícula (Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires). 2013.
83. Gándara L, Mamone L, Dotto C, Buzzola F, Casas A. Sae regulator factor impairs the response to photodynamic inactivation mediated by Toluidine blue in Staphylococcus aureus. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016 Dec;16:136-141.
84. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge AO, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med*. 2007, 39(1):59–66.
85. Gardella N, Picasso R, Predari SC, Lasala M, Foccoli M, Benchetrit G, Famiglietti A, Catalano M, Mollerach M, Gutkind G. methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains in Buenos Aires Teaching Hospitals: replacement of the multidrug resistant South American clone by another susceptible to rifampin, minocycline and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Rev Arg Microbiol*. 2005, 37:156-160
86. Gil, F. J., y Planell Estany, J. A. Aplicaciones biomédicas del titanio v sus aleaciones. 9 p. 1993.
87. Gillot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNAlII-activating components Agr and TRAP in a population of Staphylococcus aureus strains isolates from cows with mastitis. *J Clin Microbiol*. 2002, 40:4060-4067.

88. Giraudo AT, Calzolari A, Cataldi AA, Bogni C, Nagel R. Corrigendum to: "The sae locus of staphylococcus aureus encodes a two-component regulatory system". FEMS Microbiol Lett. 1999, 180:117.
89. Giraudo AT, Cheung AL, Nagel R. The sae locus of Staphylococcus aureus controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. Arch Microbiol. 1997, 168:53-58.
90. Giraudo AT, Mansilla C, Chan A, Raspanti C, Nagel R. Studies on the expression of regulatory locus sae in Staphylococcus aureus. Curr Microbiol. 2003, 46:246-250.
91. Grinholc M, Szramka B, Olender K, Graczyk A. Bactericidal effect of photodynamic therapy against methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain with the use of various porphyrin PSs. Acta Biochimica Pol 2007;54:665–670.
92. Goldstein, Irwin J.; Poretz, Ronald D. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In Liener, Irvin E.; Sharon, Nathan; Goldstein, Irwin J. *The Lectins Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. Elsevier. 2012, pp. 33–247. ISBN 978-0-323-14444-5.
93. Gonçalves F, Zanetti AL, Zanetti RV, Martelli FS, Avila-Campos MJ, Tomazinho LF, Granjeiro JM. Effectiveness of 980-nm diode and 1064-nm extra-long-pulse 83 neodymium-doped yttrium aluminum garnet lasers in implant disinfection. Photomed Laser Surg. 2010, 28(2):273-80.
94. Götz F. Staphylococcus and biofilms. Mol Microbiol. 2002, 43:1367-1378.
95. Greene C, McDevitt D, Francois P, Vaudaux PE, Lew DP, Foster TJ. Adhesion properties of mutants of Staphylococcus aureus defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of fnb genes. Mol Microbiol. 1995,17:1143-1152.
96. Harris F, Pierpoint L. Photodynamic therapy based on 5-aminolevulinic acid and its use as an antimicrobial agent. Med Res Rev. 2012, 32(6):1292-1327.
97. Hass BS, Webb RB. Photodynamic effects of dyes on bacteria. Mutagenesis by acridine orange and 500-nm monochromatic light in strains of Escherichia coli that differ in repair capability. Mutat Res. 1979, 60:1-11.
98. Hodgkinson N, Kruger CA, Mokwena M, Abrahamse H. Cervical Cancer Cells (HeLa) Response to Photodynamic Therapy using a Zinc Phthalocyanine Photosensitizer. J Photochem Photobiol B. 2017

99. Horsburgh MJ, Aish JL, White IJ, Shaw L, Lithgow JK, Foster SJ. σ B Modulates Virulence Determinant Expression and Stress Resistance: Characterization of a Functional rsbU Strain Derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J Bacteriol.* 2002, 184(19):5457–5467.
100. Housley, K. L.,. *Black sand: the history of titanium*, Hartford, Estados Unidos, Metal Management Aerospace 2007.
101. Hsieh CH, Huang YH, Chen CP, Hsieh BC, Tsa T. 5-Aminolevulinic acid induced photodynamic inactivation on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Food and Drug Analysis.* Volume 22, Issue 3, 2014, Pages 350-355.
102. Hsu CY, Shu JC, Lin MH, Chong KY, Chen CC, Wen SM, Hsieh YT, Ting W. High Glucose Concentration Promotes Vancomycin-Enhanced Biofilm Formation of Vancomycin-Non-Susceptible *Staphylococcus aureus* in Diabetic Mice. *LiaoPLoS One.* 2015, 5;10(8):e0134852..
103. Ingavale S, van Wamel W, Luong TT, Lee CY, Cheung AL. Rat/MgrA, a regulator of autolysis, is a regulator of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2005, 73:1423-1431.
104. Jackson AH, Rao KR, Smith SG. High-pressure-liquid-chromatographic analysis of tetracarboxylic porphyrins in hepatic porphyrias. *Biochem J.* 1982, 207(3):599-603.
105. Jacobs NJ, Jacobs JM, Brent P. Characterization of the late steps of microbial heme synthesis: conversion of coproporphyrinogen to protoporphyrin. *J Bacteriol.* 1971,107(1):203-209.
106. Jacobs NJ, Jacobs JM, Sheng G.S. Effect of Oxygen on Heme and Porphyrin Accumulation from s-Aminolevulinic Acid by Suspensions of Anaerobically Grown *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology*, 1969, p. 37-41
107. Janzon L, Arvidson S. The role of the α -hemolysin gene (hld) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.* 1990, 9:1391-1399.
108. Jeric PE, Matteo M, Ramirez MS, Couto E, Tokumoto M, Centron D. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates reveals the spreading of a new clone in Buenos Aires city. *Medicina (Buenos Aires).* 2006, 66:36-39.
109. Ji G, Beavis R, Novick R. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1995, 92:12055-12059.

110. Johnson M, Cockayne A, Morrissey JA. Iron-regulated biofilm formation in *Staphylococcus aureus* Newman requires ica and the secreted protein Emp. *Infect Immun*. 2008, 76:1756-1765.
111. Jonsson M, Arvidson S, Foster S, Tarkowski A. Sigma Factor B and RsbU Are Required for Virulence in *Staphylococcus aureus*-Induced Arthritis and Sepsis. *Infect Immun*. 2004, 72(10):6106–6111.
112. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, Fantetti L, Chiti G, Roncucci G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med*. 2006, 38:468–481.
113. Kamel, M. S., Khosa, A., Tawse-Smith, A., y Leichter, J. The use of laser therapy for dental implant surface decontamination: a narrative review of in vitro studies. *Lasers in medical science*, 2014, 29(6), 1977-1985.
114. Kaplan JK, Ragunath C, Velliyagounder K, Fine DH, Ramasubbu N. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004, 48:2633–2642.
115. Kaplan S. Implications of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a community-acquired pathogen in pediatric patients. *Infect Dis Clin North Am*. 2005, 19:747-757.
116. Karrer S, Szeimies RM, Ernst S, Abels C, Baumler W, Landthaler M. Photodynamic inactivation of staphylococci with 5-aminolaevulinic acid or photofrin. *Lasers Med Sci*. 1999, 14:54–61.
117. Kaushik M, Kumar S, Kapoor RK, Viridi JS, Gulati P. Integrins in enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 Oct 13. pii: S0924-8579(17)30368-0.
118. Kim SY, Kim EJ, Park JW. Control of singlet oxygen-induced oxidative damage in *Escherichia coli*. *J. Biochem Mol Biol*. 2002, 35:353–357.
119. King ND, O'Brien MR. Identification of the *lrp* gene in *Bradyrhizobium japonicum* and its role in regulation of delta-aminolevulinic acid uptake. *J Bacteriol* 1997;179:1828–1831.
120. Kossakowska M, Nakonieczna J, Kawiak A, Kurlenda J, Bielawski KP, Grinholc M. Discovering the mechanisms of strain-dependent response of *Staphylococcus aureus* to photoinactivation: oxidative stress toleration, endogenous porphyrin level and strain's virulence. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013 Dec;10(4):348-55.

121. Lambert CR, Reddi E, Spikes JD, Rodgers MA, Jori G. The effects of porphyrin structure and aggregation state on photosensitized processes in aqueous and micellar media. *Photochem Photobiol.* 1986 Nov;44(5):595-601.
122. Lasa, I., Del Pozo, J. L., Penades, J. R., y Leiva, J. Biopelículas bacterianas e infección. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 28, No. 2, pp. 163-175). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud. 2005.
123. Lauderdale KJ, Boles BR, Cheung AL, Horswill AR. Interconnections between Sigma B, agr, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *Infect Immun.* 2009, 77(4):1623-1635.
124. Lina G, Ji G, Greenland T, Pedraza A, Etienne J, Novick RP, Vandenesch F. Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the agr signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 1998, 28:655-662.
125. Lazzeri D, Rovera M, Pascual L, Durantini EN. Photodynamic studies and photoinactivation of *Escherichia coli* using meso-substituted cationic derivatives with asymmetric charge distribution, *Photochem Photobiol.* 2004, 80:286-293.
126. Le Guern F, Sol V, Ouk C, Arnoux P, Frochot C, and Ouk TS. Enhanced photobactericidal and targeting properties of a cationic porphyrin following attachment of Polymyxin B. *Bioconjug Chem.* 2017 Sep 20;28(9):2493-2506.
127. Lee CY, Lee JC. Staphylococcal capsule in Gram-positive pathogens. 2000, p.361-366.
128. Lee CF, Lee CJ, Chen CT, Huang CT. 5-Aminolaevulinic acid mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Pseudomonas aeruginosa* planktonic and biofilm cultures. *J Photochem Photobiol B.* 2004, 75:21–25.
129. Li X1, Guo H, Tian Q, Zheng G, Hu Y, Fu Y, Tan H. Effects of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on antibiotic-resistant staphylococcal biofilm: an in vitro study. *J Surg Res.* 2013 Oct;184(2):1013-21.
130. Lin HY, Chen CT, Huang CT. Use of merocyanine 540 for photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm cells. *Appl Environ Microbiol.* 2004, 70(11):6453-6458.

131. Liu C, Zhou Y, Wang L, Han L, Lei J, Ishaq HM, Xu J. Mechanistic aspects of the photodynamic inactivation of vancomycin-resistant Enterococci mediated by 5-aminolevulinic acid and 5-aminolevulinic acid methyl ester. *Curr Microbiol.* 2015 Apr;70(4):528-35. doi: 10.1007/s00284-014-0757-7.
132. Longo JPF, Muchlmann LA, Azevedo RB, Nanostructured Carriers for Photodynamic Therapy Applications in microbiology , in Science against microbial pathogens communicating current research and technological advances. 2011, p.189-196.
133. Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med.* 1998, 339:520-532
134. Luong TT, Newell SW, Lee CY. Mgr, a novel global regulator in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol.* 2003, 185:3703-3710.
135. Luong TT, Dunman PM, Murphy E, Projan SJ, Lee CY. Transcription Profiling of the mgrA Regulon in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol.* 2006, 188:1899-1910.
136. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., y Clark, D. P. Brock biology of microorganisms 12th edn. Int. Microbiol. 2008.
137. Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D. Brock Biology of Microorganisms, 12th edition. Pearson Education Inc. 2009.
138. Lippa P, Jacob K, Ehret W. JThe Pathological Society of Great Britain and Ireland The production of porphyrins from 6-aminolaevulinic acid by Haemophilus parainfluenzae. . *Med. Microbiol. - Vol. 39* (1993), 262-267 0 1993.
139. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001, 9(1):34-39.
140. Mainiero M, Goerke C, Geiger T, Gonser C, Herbert S, Wolz C. Differential target gene activation by the Staphylococcus aureus two-component system saeRS. *J Bacteriol.* 2010; 192:613-623.
141. Maisch T, Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. *Photochem Photobiol Sci.* 2015, 14(8):1518-1526.
142. Malik Z., H. Ladan and Y. Nitzan. 1992. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *J.Photochem. Photobiol.* 14:262.

143. Mang, T., Rogers, S., Keinan, D., Honma, K., y Baier, R. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) induction of biopelícula matrix architectural and bioadhesive modifications. Photodiagnosis and photodynamic therapy, 2016, 13, 22-28.
144. Marotti, J., Tortamano, P., Cai, S., Simões Ribeiro, M., Miranda Franco, J. E. y Toyota de Campos, T. Decontamination of dental implant surfaces by means of photodynamic therapy. Lasers Med Sci, 2013, 28: 303–309.
145. Masiera N, Bojarskab A, Gawryszewskab I, Sadowyb E, Hryniewicz W, Waluka J. Antimicrobial photodynamic therapy by means of porphycene photosensitizers. J Photochem Photobiol B. 2017.
146. Mauzerall M, Granick S. The occurrence and determination of 5-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. J. Biol. Chem. 1956, 219: 435-437.
147. McConda, D. B., Karnes, J. M., Hamza, T. y Lindsey, B. A. A novel co-culture model of murine K12 osteosarcoma cells and *S. aureus* on common orthopedic implant materials: ‘the race to the surface’ studied in vitro. Biofouling, 2016, 32:6, 627-634.
148. McSwain BS, Irvine RL, Hausner M, Wilderer PA. Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. Appl Environ Microbiol. 2005 Feb;71(2):1051-7.
149. Medaney F, Dimitriu T, Ellis RJ, Raymond B. Live to cheat another day: bacterial dormancy facilitates the social exploitation of β -lactamases. The ISME Journal (2016) 10, 778–787
150. Merchat M, Bertolini G, Giacomini P, Villanueva A, Jori G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. J Photochem Photobiol B. 1996, 32:153-157.
151. Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E, Lopez JA, Foster TJ, Penadés JR, Lasa I. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 2009, 191:832-843.
152. Meyle. Surface treatment and marginal bone loss. Eur J Oral Implantol. 2012, 1(Suppl): S1-S11.
153. Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. Expert Rev Anti Infect Ther. 2014, 12:1221–1236

154. Misba L, Zaidi S, Khan AU. A comparison of antibacterial and antibiofilm efficacy of phenothiazinium dyes between Gram positive and Gram negative bacterial biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017 Jun;18:24-33.
155. Moan J, Peng Q. An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Res*. 2003, 23(5A):3591-3600.
156. Mora SJ, Milanesio ME, Durantini EN. Spectroscopic and photodynamic properties of 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N-dimethylaminopropoxy)phenyl]porphyrin and its tetracationic derivative in different media. *J Photochem Photobiol A*. 2013, 270:75-84.
157. Morley S, Griffiths J, Philips G, Moseley H, O'Grady C, Mellish K, Lankester CL, Faris B, Young RJ, Brown SB, Rhodes LE. Phase IIa randomized, placebo-controlled study of antimicrobial photodynamic therapy in bacterially colonized, chronic leg ulcers and diabetic foot ulcers: a new approach to antimicrobial therapy. *Br J Dermatol*. 2013, 168(3):617–624.
158. Narban N, Tubby S, Parkin IP, Gil-Tomas J, Ready D, Nair SP, Wilson M. Gold nanoparticles enhance the toluidine blue-induced lethal photosensitisation of *Staphylococcus aureus*. *Curr Nanosci*. 2008, 4(4):409–414.
159. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol*. 1998, 11 (1): 142-201.
160. Nazar J C. Bacterial biofilms. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* ;2007, 67: 61-72
161. Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z, Ehrenberg B. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochem Photobiol*. 1992, 55:89-96.
162. Nitzan Y, Salmon-Divon M, Shporen E, Malik Z. ALA induced photodynamic effects on gram positive and negative bacteria. *Photochem Photobiol Sci*. 2004, 3(5):430-435.
163. Nitzan Y, Shainberg B, Malik Z. Photodynamic effects of deuteroporphyrin on gram-positive bacteria. *Curr Microbiol*. 1987, 15:251e8.
164. Nogales, C. G., Ferreira, M. B., Montemor, A. F., RODRIGUES, M. F. D. A., Lage-Marques, J. L., y Antoniazzi, J. H. Ozone therapy as an adjuvant for endodontic protocols: microbiological–ex vivo study and cytotoxicity analyses. *Journal of Applied Oral Science*, 2016, 24(6), 607-613.

165. Novick R, Ross H, Projan S, Kornblum J, Kreiswirth B, Mogghazeh S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* 1993, 12:3967-3975.
166. Novick RP, Jiang D. The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with agr quorum sensing. *Microbiology.* 2003, 149:2709-2717.
167. Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol Microrev.* 2003, 48(6):1429-1449.
168. Morfeldt E, Janzon L, Arvidson S, Lofdahl S. Cloning of a chromosomal locus (exp) which regulates the expression of several exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet.* 1988, 211:435-440.
169. Nyman ES, Hynninen PH. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2004, 73(1-2):1-28.
170. O' Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev.* 2004, 17(1):218-234
171. O'Gara JP. ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* 2007, 270:179-188.
172. Olivier AC, Lemaire S, Van Bambeke F, Tulkens PM, Oldfield E. Role of rsbU and staphyloxanthin in phagocytosis and intracellular growth of *Staphylococcus aureus* in human macrophages and endothelial cells. *J Infect Dis.* 2009. 200(9):1367-70.
173. Otto M. *Staphylococcus epidermidis*: a major player in bacterial sepsis? *Future Microbiology.* 2017 VOL. 12, NO. 12.
174. Paganini H, Verdaguer V, Rodriguez AC, Della Latta P, Hernandez C, berberian G, Pinheiro JL and Rosanova MT. Infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina en niños provenientes de la comunidad en niños de la Argentina. *Arch Argent Pediatr.* 2006, 104:295-300.
175. Panek H, O' Brian MR, A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis, *Microbiology* 148 .2002, 2273-2282.

176. Parodi, M. B., Conterno, G., Pazos, L., Roth, M., Corengia, P., Egidi, D. A., y Crosta, R. Características de Superficie de Titanio atacado con Ácido Sulfúrico y Ácido Clorhídrico. Centro de Investigación y Desarrollo en Mecánica, Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), CC, 157, B1650WAB. 2004.
177. Paulsen IT, Banerjee L, Myers GS, Nelson KE, Seshadri R, Read TD, Fouts DE, Eisen JA, Gill SR, Heidelberg JF, et al. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus Faecalis*. Science. 2003, 299:2071–2074.
178. Pazos, L. M. Efecto del tratamiento de superficie en la vida a la fatiga de titanio para aplicaciones biomédicas (Tesis de ingeniería mecánica. Universidad de Buenos Aires). 2006.
179. Pazos, L., Conterno, G., Parodi, M. B., Roth, M., Egidi, D. A., Corengia, P. y Crosta, R. Tratamientos de superficie en biomateriales: ataque ácido de superficies de titanio. 2004. 5º Jornadas de desarrollo e innovación tecnológica. 1-2.
180. Pazos, L., Svoboda, H. y Corengia, P. Tratamientos de superficie para implantes dentales: influencia en la vida a la fatiga. 2007. 6º Jornadas de desarrollo e innovación tecnológica. 1-5.
181. Pelz A, Wieland KP, Putzbach K, Hentschel P, Albert K, Götz F. Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem. 2005, 280(37):32493-32498.
182. Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J, Schliebert P. Cloning, characterization and sequencing of an accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 1988, 170:4365-4372.
183. Pereira MA, Faustino MA, Tomé JP, Neves MG, Tomé AC, Cavaleiro JA, Cunha Â, Almeida A. Influence of external bacterial structures on the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin. Photochem Photobiol Sci. 2014, 13:680-690.
184. Perni S, Pratten J, Wilson M, Piccirillo C, Parkin IP, Prokopovich P. Antimicrobial properties of light-activated polyurethane containing indocyanine green. J Biomater Appl. 2011, 25:387-400
185. Pervaiz S, Olivo M. Art and science of photodynamic therapy. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2006, 33(5-6):551-6.
186. Pesewu GA, Cutler RR, Humber DP. Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. J Ethnopharmacol. 2008, 116: 102-111.

187. Phoenix DA, Harris F. Light activated compounds as antimicrobial agents—Patently obvious? *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2006;1:181–199
188. Postigo A, Funes M, Petenatti E, Bottaid H, Pacciarone A, Sortino M. Antifungal photosensitive activity of *Porophyllum obscurum* (Spreng.) DC.: Correlation of the chemical composition of the hexane extract with the bioactivity. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017
189. Qadri, T. The effect of therapeutic and Nd:YAG laser as an adjunct treatment modality in periodontal therapy. Thesis for doctoral degree. Karolinska Institutet. 2010.
190. R. de la Fuente a, K.H. Schleifer b, F. Gotz b and H.-P. Kost. Accumulation of porphyrins and pyrrole pigments by *Staphylococcus aureus* ssp. *anaerobius* and its aerobic mutant. *FEMS Microbiology Letters* 35. 1986, 183-188.FEMS.
191. Ramos RR, Kozusny-Andreani DI, Fernandes AU and da Silva Baptista M. Photodynamic action of protoporphyrin IX derivatives on *Trichophyton rubrum*. *An Bras Dermatol*. 2016 Mar-Apr; 91(2): 135–140.
192. Ramstad S, Anh-Vu N L, Johnsson A. The temperature dependence of porphyrin production in *Propionibacterium acnes* after incubation with 5-aminolevulinic acid (ALA) and its methyl ester (m-ALA). *Photochemical & Photobiological* ,2005.
193. Reddi E, Ceccon M, Valduga G, Jori G, Bommer JC, Elisei F, Latterini L, Mazzucato U. Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins. *Photochem Photobiol*. 2002, 75:462-470.
194. Rigo, E. C. S., Oliveira, L. C., Santos, L. A., Carrodéguas, R. G., y Boschi, A. O. Implantes metálicos recobertos com hidroxiapatita. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, 1999, 15(1-2), 21-29.
195. Rodrigo-Troyano A, Sibila O. The respiratory threat posed by multidrug resistant Gram-negative bacteria. *Respirology*. 2017 Oct;22(7):1288-1299.
196. Romeo T. Bacterial biofilms. Preface. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322:v.
197. Ruiz JA, Fernández RO, Nikel PI, Méndez BS, Pettinari MJ. dye (arc) Mutants: insights into an unexplained phenotype and its suppression by the synthesis of poly (3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli* recombinants. *FEMS Microbiol Lett*. 2006, 258(1):55-60.

198. Sailer R, Strauss WSL, König K, Ruck A, Steiner R. Correlation between porphyrin biosynthesis and photodynamic inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* after incubation with 5 aminolaevulinic acid. *J Photochem Photobiol B* 1997;39:236–242
199. Saino E, Sbarra MS, Arciola CR, Scavone M, Bloise N, Nikolov P, Ricchelli F, Visai L. Photodynamic action of Tri-meso (N-methyl-pyridyl), meso (N-tetradecyl-pyridyl) porphine on *Staphylococcus epidermidis* biofilms grown on Ti6Al4V alloy. *Int J Artif Organs*. 2010, 33:636-45.
200. Sass P, Bierbaum G. Lytic activity of recombinant bacteriophage phi-11 and phi-12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*. 2007, 73:347–352.
201. Sbarra MS, Arciola CR, Di Poto A, Saino E, Rohde H, Speziale P, Visai L. The photodynamic effect of tetra-substituted N-methyl-pyridyl-porphine combined with the action of vancomycin or host defense mechanisms disrupts *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Int J Artif Organs*. 2009,32: 574-583.
202. Schafer M, Schmitz C, Horneck G. High sensitivity of *Deinococcus radiodurans* to photodynamically-produced singlet oxygen. *Int J Radiat Biol*. 1998, 74:249-253.
203. Sharma M, Visai L, Bragheri F, Cristiani I, Gupta PK, Speziale P. Toluidine blue mediated photodynamic effects on *Staphylococcal* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008, 52:299–305
204. Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today*. 1999, 4:507-517
205. Shim, I. K., Chung, H. J., Jung, M. R., Nam, S. Y., Lee, S. Y., Lee, H., ... y Lee, S. J.. Biofunctional porous anodized titanium implants for enhanced bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2014, 102(10), 3639-3648.
206. Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers Surg Med*. 2003, 33(3):161–168.
207. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol* 2000. 2011 Feb;55(1):143-66.

208. Sperandio FF, Huang YY, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2013, 8:108-120.
209. Steinhuber A, Goerke C, Bayer MG, Doring G, Wolz C. Molecular architecture of the regulatory Locus sae of *Staphylococcus aureus* and its impact on expression of virulence factors. *J Bacteriol.* 2003; 185:6278-6286.
210. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* 2012 Dec;114(8):785-96.
211. Strauss WS, Sailer R, Schneckenburger H, Akgün N, Gottfried V, Chetwer L, Kimel S. Photodynamic efficacy of naturally occurring porphyrins in endothelial cells in vitro and microvasculature in vivo. *J Photochem Photobiol B.* 1997 Jun;39(2):176-84.
212. Szafranski, S. P., Winkel, A., y Stiesch, M. The use of bacteriophages to biocontrol oral biopelículas. *Journal of biotechnology*, 2017, 250, 29-44.
213. Szocs K, Gabor F, Csik G and Fidy J, δ -aminolevulinic acid induced porphyrin synthesis and photodynamic inactivation of *Escherichia coli* B, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1999, 50, 8–17.
214. Szocs K, Csik G, Kaposi AD and Fidy J, In situ detection of ALA stimulated porphyrin metabolic products in *Escherichia coli* B by fluorescence line narrowing spectroscopy, *Biochem. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 2001, 1541, 170–178.
215. Tim M. Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B.* 2015 Sep;150:2-10.
216. Tinoco, J. M., Liss, N., Zhang, H., Nissan, R., Gordon, W., Tinoco, E., Sassonea, L. y Stevens, R. Antibacterial Effect of Genetically-Engineered Bacteriophage ϕ Ef11/ ϕ FL1C (Δ 36) P *nisA* on Dentin Infected with Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecalis*. *Archives of Oral Biology.* 2017.
217. Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M. J., Cucarella, C., Lamata, M y Lasa, I. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biopelícula formation. *Applied and environmental microbiology*, 67(10), 2001, 4538-4545.

218. Tornero E, Senneville E, Euba G, Petersdorf S, Rodriguez-Pardo D, Lakatos B, Ferrari MC, Pílares M, Bahamonde A, Trebse R, et al. Characteristics of prosthetic joint infections due to *Enterococcus* sp. and predictors of failure: A multi-national study. Clin Microbiol Infect. 2014;20:1219–1224.
219. Trotonda MP, Tamber S, Memmi G, Cheung AL. MgrA represses biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 2008, 76:5645-5654.
220. Tu Quoc PH, Genevaux P, Pajunen M, Savilahti H, Georgopoulos C, Schrenzel J, Kelley WL. Isolation and characterization of biofilm formation-defective mutants of *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 2007, 75(3):1079-1088.
221. Truong, V. K., Pham, V. T. H., Medvedev, A., Lapovok, R., Estrin, Y., Lowe, T. C., Baulin, V., Boshkovikj, V., Fluke, C. J., Crawford, R. J. e Ivanova, E. Self-organised nanoarchitecture of titanium surfaces influences the attachment of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol, 2015, 99: 6831-6840.
222. Tzianabos AO, Wang JY, Lee JC. Structural rationale for the modulation of abscess formation by *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Proc Natl Acad Sci USA. 2001, 98(16):9365-9670.
223. Valderas MW, Gatson JW, Wreyford N, Hart ME, The superoxide dismutase gene *sodM* is unique to *Staphylococcus aureus*: absence of *sodM* in coagulase-negative staphylococci, Journal of Bacteriology, 184 (2002) 2465-2472.
224. Valle J, Toledo-Arana A, Berasain C, Ghigo JM, Amorena B, Penadés JR, Lasa I. Mol Microbiol. 2003, 48(4):1075-1087.
225. Van Tyne D, Gilmore MS. Friend Turned Foe: Evolution of Enterococcal Virulence and Antibiotic Resistance. Annu Rev Microbiol. 2014, 337–356.
226. van Wamel W, Xiong YQ, Bayer AS, Yeaman MR, Nast CC, Cheung AL. Regulation of *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharides by *agr* and *sarA* in vitro and in an experimental endocarditis model. Microb Pathog. 2002; 33:73-79
227. Vanegas, A., Carlos, J., Landinez, N. S., y Garzón-Alvarado, D. A. Generalidades de la interfase hueso-implante dental. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 2009, 28(3), 130-146.

228. Veerachamy, S., Yarlagadda, T., Manivasagam, G. y Yarlagadda, P. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. *J engineering in medicine*, 2014, 228 (10) 1083-1099.
229. Verderber E, Lucast LJ , van Dehy JA, Cozart P, Etter JB, Best EA. Role of the hemA gene product and d-aminolevulinic acid in regulation of *Escherichia coli* heme synthesis. *Journal of Bacteriology*, 1997, 4583–4590
230. Verkamp, E., V. M. Backman, J. M. Bjornsson, D. Soll, and G. Eggertsson. The periplasmic dipeptide permease system transports 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1993, 175:1452–1456.
231. Viana G, Medeiros AC, Lacerda AM, Leal LK, Vale T, Matos FJ. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. *BMC Pharmacol.* 2004, 4:9.
232. Waldvogel FA. Gram-positive cocci,. In J. E. B. G. L. Mandell, and R. Dolin (ed.), *Principles and practice of infectious disease*, 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia. 2000, 2069-2092.
233. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol.* 2000, 182(10):2675-2679.
234. Wainwright M. Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. *Chem Soc Rev.* 1996, 25:351-359.
235. Wainwright, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 1998, 42(1), 13-28.
236. Wilder-Smith, C. H., P. Wilder-Smith, P. Grosjean, H. van den Bergh, A. Woodtli, P. Monnier, G. Dorta, F. Meister, and G. Wagnie`res. Photoeradication of *Helicobacter pylori* using 5-aminolevulinic acid: preliminary human studies. *Lasers Surg. Med.* 2002, 31:18–22
237. Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res.* 1976, 36(7):2326-2329.
238. Zand, V., Milani, A. S., Amini, M., Soroush Barhaghi, M. H., Lotfi, M., Rikhtegaran, S. y Sohrabi, A. Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy and sodium hypochlorite on monoculture biopelículas of *Enterococcus faecalis* at different stages of development. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2014, 32(5): 245-250.
239. Zanin IC, Lobo MM, Rodrigues LK, Pimenta LA, Höfling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci.* 2006, 114:64-69.

240. Zhang J, Kang K, Chen J, Du G. Optimization of the heme biosynthesis pathway for the production of 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli* . Scientific Reports 5, Article number: 8584. 2015.
241. Zhang QZ, Zhao KQ, Wu Y, Li XH, Yang C, Guo LM, Liu CH, Qu D, Zheng CQ. 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy and its strain-dependent combined effect with antibiotics on *Staphylococcus aureus* biofilm. PLoS One. 2017, 12(3):e0174627
242. Zhou LX, Ding Y. A cinnamide derivative from *Solanum verbascifolium* L. J Asian Nat Prod Res. 2002, 4:185-187.